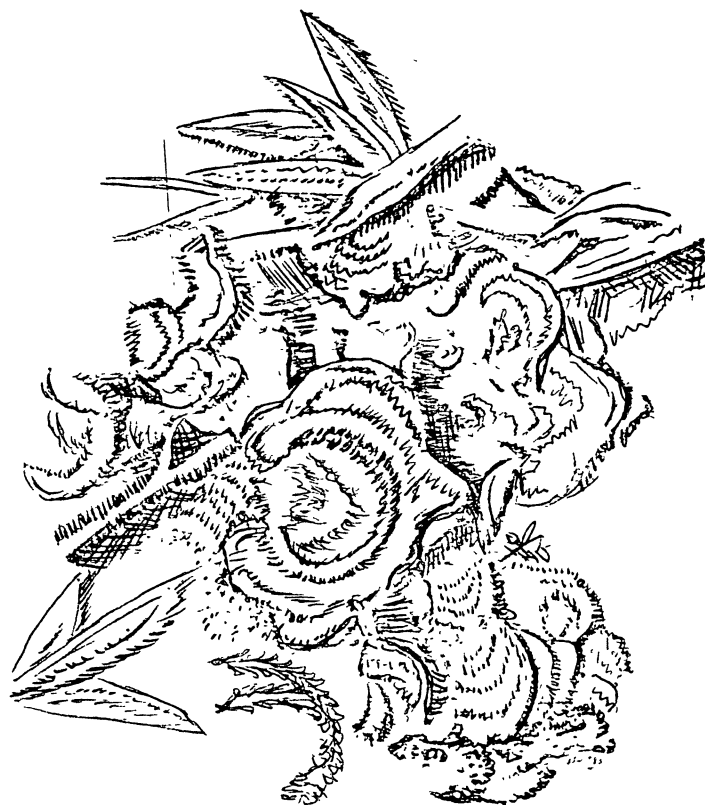


SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE α, α -D-TREALOSE,
 β -D-GLUCANA E DE UM HETEROPOLISSACARÍDEO DO BASIDIO-
LÍQUEN *CORA PAVONIA* (Sw.) Fr.

Tese apresentada ao Departamento
de Bioquímica da Universidade Fe-
deral do Paraná para a obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

1985

Orientador: Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Dr. Philip A.J. Gorin

*Esse trabalho é dedicado com
respeito e amor ao meu marido
Pedro, ao meu filho Rafael e
aos meus pais.*

*Do Senhor é a terra e tudo o que
nela existe.*

*Nada Lhe é oculto e nada Lhe pas-
sa despercebido. Ele conhece todos os
mistérios da ciência.*

*Foi Ele que estabeleceu limites
ao mar para que dali não ultrapasse.*

*Foi Ele que estabeleceu os tempos
as estações, e as constelações nos céus.*

*Foi Ele que nos deu vida através
de Seu Filho.*

Obrigada

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

AcOH	- ácido acético.
cm	- centímetro.
c.p.	- cromatografia em papel.
^{13}C -n.m.r.	- ressonância nuclear magnética de carbono treze.
d.i.	- diâmetro interno.
D ₂ O	- Óxido de deutério.
g	- grama (s).
g.l.c.	- cromatografia em fase gasosa.
g.l.c.-m.s.	- cromatografia líquida-gasosa e espectrometria de massa.
h	- hora.
Hz	- Hertz.
km	- quilômetro.
L	- litro.
mL	- mililitro
m/e	- massa/carga do elétron.
mA	- miliAmpère.
MHz	- megaHertz .
mg	- miligrama (s).
M	- molar.
m	- metro.
min	- minuto .

mm	- milímetro.
nm	- nanometro.
NaBH_4	- boroidreto de sódio.
p/p	- peso/peso.
p/v	- peso/volume.
p.f.	- ponto de fusão.
p.p.m	- partes por milhão.
r.p.m.	- rotação por minuto.
R_{GAL} e R_{I}	- mobilidade relativa na cromatografia em papel referente aos padrões utilizados de galactose e mio-inositol, respectivamente.
s	- segundo (s).
μs	- microsegundos.
\underline{s}	- coeficiente de sedimentação.
S	- Svedberg.
TFA	- ácido trifluoracético.
TMS	- tetrametilsilano.
δ	- delta (em p.p.m).
T	- tempo de retenção em g.l.c.
v/v	- volume/ volume.
o	- grau (s) em rotação óptica e grau(s) Celsius.

ÍNDICE

	Pagina
ABSTRACT	IX
RESUMO	XI
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	18
Métodos gerais	18
Coleta e preparo do material	22
Isolamento e cristalização da α, α - <u>D</u> -trealose ...	22
Isolamento e purificação dos polissacarídeos ob- tidos por extração aquosa	23
Isolamento e purificação dos polissacarídeos ob- tidos por extração alcalina	24
Hidrólise ácida dos polissacarídeos	25
Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida	25
Desproteínização do heteropolissacarídeo e β - <u>D</u> - glucana obtidos da extração aquosa	26
Cromatografia em coluna de Sepharose 4B-200 do heteropolissacarídeo	27

Determinação enzimática da <u>D</u> -galactose no hete- ropolissacarídeo	27
Determinação enzimática da <u>L</u> -fucose no heteropo- lissacarídeo	27
Derivatização e preparação das amostras monossa- carídicas (preparação dos 2-octil-glicosídeos a- cetilados), e exame por g.l.c.-m.s. para a deter- minação das formas enantioméricas	28
Metilação do heteropolissacarídeo	29
Metilação da glucana	30
Metilação da α, α - <u>D</u> -trealose.....	30
Análise dos produtos de hidrólise ácida das amos- tras metiladas	30
Determinação do consumo de meta-periodato e áci- do fórmico liberado do heteropolissacarídeo	31
Degradação de Smith (hidr. suave) dos polissacarídeos...	32
Ultracentrifugação dos polissacarídeos	33
Ressonância de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo e dos polissacarídeos	34
Componentes amino-acídicos do líquen bruto	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Isolamento, purificação e composição do oligossa- carídeo e dos polissacarídeos	36
Extração aquosa dos polissacarídeos	39
Extração alcalina dos polissacarídeos	43
Ultracentrifugação dos polissacarídeos	44
Eletroforese dos polissacarídeos	51
Eluição do heteropolissacarídeo em coluna de Se-	

pharose 4B-200	51
Análise estrutural do componente glucana	53
Determinação da configuração absoluta dos compo - nentes monossacarídicos obtidos do heteropolissa- carídeo.....	55
Análise estrutural do heteropolissacarídeo	62
CONCLUSÕES	71
AGRADECIMENTOS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
I Composição em aminoácidos do líquen <i>Cora pavonia</i> (conteúdo proteico de 36,05%)	38
II Detecção por g.l.c. dos acetatos de alditóis par - cialmente <u>O</u> -metilados formados do extrato metanol- aquoso por análise de metilação	40
III Análise por g.l.c. A) dos produtos de hidrólise ácida total da fração solúvel em água fria (sobre nadante) resultante do congelamento e degelo do extrato aquoso e B) dos produtos de hidrólise áci da total do extrato alcalino (precipitado etanóli co total), na forma de acetatos de alditóis	45
IV Análise por g.l.c. dos resultados de hidrólise á- cida total dos precipitados de Fehling A) extra - ção aquosa e B) extração alcalina, na forma de ace tatos de alditóis	46
V Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parci almente <u>O</u> -metilados obtidos da β - <u>D</u> -glucana	54
VI Tempos de retenção relativos, forma do anel, e per- centagem das áreas dos picos por g.l.c. dos glicosí deos (-)-2-octil acetilados obtidos de amostras pa drões e frações provenientes da coluna de celulose...	57

VII	Análise por g.l.c. dos resultados da degradação de Smith incorporando condições hidrolíticas suaves do polissacarídeo insolúvel em etanol (extração aquosa) na forma de acetatos de alditóis.....	64
VIII	Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos do polissacarídeo metilado rico em manose, derivado da degradação de Smith do heteropolissacarídeo.....	65
IX	Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente <u>O</u> -metilados obtidos do heteropolissacarídeo.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo α, α - <u>D</u> -trealose.....	41
2	Espectro de ^{13}C -n.m.r. da β - <u>D</u> -glucana (extração aquosa).....	47
3	Espectro de ^{13}C -n.m.r. do heteropolissacarídeo (A- extração aquosa e B- extração alcalina).....	48
4	Análise por ultracentrifugação dos componentes A) β - <u>D</u> -glucana e B) heteropolissacarídeo.....	50
5	Cromatografia do heteropolissacarídeo em coluna de Sepharose 4B-200.....	52
6	Perfil obtido por g.l.c.-m.s. dos derivados acetilados (-)-2-octil glicosídeos formados por derivatização das frações provenientes da coluna de celulose, contendo ramnose e fucose (A) e fucose e xilose (B).....	58
7	Espectros de massa por impacto eletrônico dos derivados acetilados (-)-2-octil glicosídeos de fucopirranose (A), fucofuranose (B), xilopirranose (C), xilofuranose (D), manopirranose (E), e manofuranose (F).....	59
8	Curva de oxidação com meta-periodato do heteropolissacarídeo (extração aquosa).....	68

ABSTRACT

~~*Cora pavonia*~~ is an unusual lichen having a basidiomycetous mycosymbiont. It is very rich in protein (36%), of which 10% is tyrosine. α, α -D-Trehalose is present as 4.3% of the total lichen.

The lichen contains polysaccharides typical of basidiomycetes and different from those of ascomycetes and ascomycetous lichens. Hot aqueous extraction followed by treatment of the ethanol-insoluble extract with Fehling solution provided, via its insoluble copper complex, a heteropolysaccharide (5.1% protein) which was homogeneous on ultracentrifugation (2,6S), electrophoresis, and gel filtration. From the mother liquor was isolated a glucan which was homogeneous on ultracentrifugation (1,4S) and electrophoresis.

The heteropolysaccharide contained 6 monosaccharides, whose enantiomeric configurations were determined. Hydrolysis of the polysaccharide followed by a partial fractionation of the hydrolyzate by cellulose column chromatography, derivatization of each fraction to form acetates of (-)-2-octyl glycosides, and examination of the products by g.l.c.-m.s., gave peaks whose retention times and mass spectra indicated the presence of L-rhamnose, L-fucose, D-xylose, D-mannose, D-glucose, and D-galactose. The use of m.s. in enantiomeric determinations

represented an advance over the previous method which was based on comparison of retention times and relative proportions of peaks of acetates of octyl glycosides with those of standards. This was previously carried out on less complicated monosaccharide mixtures, but in the present study impurities were detected in each fraction obtained by cellulose column chromatography and m.s. was needed as a further parameter in peak-identification.

Analysis of the heteropolysaccharide showed that it contained principally xylose and mannose with a mannose-containing nucleus. The main chain consisted mainly (60%) of (1 → 3)-linked α -D-mannopyranosyl units which were unsubstituted (10%), or 4-O- (10%) and 2,4-di-O-substituted (10%) with units of β -D-xylopyranose. In the methylation analysis of the heteropolysaccharide, a capillary column of DB-210 proved to be particularly useful for more efficient g.l.c. resolution of partially O-methylated alditol acetates.

The glucan had the β -D-configuration and was highly branched with 21% of nonreducing end-units with 3-O- (30%), 6-O- (30%), and 3,6-di-O-substituted residues (19%), and had a main chain consisting of interspersed (1 → 3) and (1 → 6) linkages.

RESUMO

Cora pavonia é um dos poucos líquens cujo micossimbionte é um basidiomiceto e não um ascomiceto. É muito rico em proteína (36%), dos quais 10% é tirosina. A α, α -D-trealose foi isolada do líquen com um rendimento de 4,3 %.

O líquen contém polissacarídeos típicos de basidiomicetos e diferentes daqueles de ascomicetos e líquens ascomicetos. Extração aquosa quente seguida por tratamento do extrato insolúvel em etanol com solução de Fehling forneceu, via seu complexo cúprico insolúvel, um heteropolissacarídeo (contendo 5,1% de proteína), que foi homogêneo por ultracentrifugação (2,6S), eletroforese, e filtração em gel. Do sobrenadante de Fehling foi isolada a glucana, que foi homogênea por ultracentrifugação (1,4S) e eletroforese.

O heteropolissacarídeo continha seis monossacarídeos cujas configurações enantioméricas foram determinadas. Hidrólise do polissacarídeo seguida por um fracionamento parcial do hidrolisado por cromatografia em coluna de celulose, derivatização de cada fração para formar acetatos de (-)-2-octil glicosídeos, e exame por g.l.c.-m.s., forneceu picos cujos tempos de retenção e espectrometria de massa indicaram a presença de L-ramnose, L-fucose, D-xilose, D-manose, D-glucose, e D-galactose. O uso de m.s. em determinações enantioméricas representou

um avanço sobre os métodos prévios que eram baseados na comparação dos tempos de retenção e proporções relativas dos picos dos acetatos de actil glicosídeos com aqueles de padrões. Estas técnicas foram previamente conduzidas em misturas monossacarídicas menos complicados, mas no presente estudo foram detectadas impurezas em cada fração obtida por cromatografia em coluna de celulose, e m.s. foi necessária como um parâmetro ~~extra na identificação dos picos.~~

Análises do heteropolissacarídeo mostraram que ele continha principalmente xilose e manose com um núcleo contendo manose. A cadeia principal consistia principalmente (60 %) de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 3), que eram não substituídas (10%) ou 4-O-(10%) e 2,4-di-O-substituídas (10%) por unidades de β -D-xilopirranose. Nas análises de metilação do heteropolissacarídeo, uma coluna capilar de DB - 210 mostrou ser particularmente útil para resolução mais eficiente por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados.

A glucana tinha uma configuração β -D sendo altamente ramificada com 21% de unidades terminais não redutoras, com resíduos 3-O- (30%), 6-O- (30%) e 3,6-di-O-substituídos (19%), e tinha uma cadeia principal consistindo de ligações intercaladas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6).

INTRODUÇÃO

Galactomananas de Líquens

Em 1729 Micheli (20) empregou pela primeira vez o termo "líquen", planta rasteira ou lambe-chão. A verdadeira natureza dos líquens, porém só foi reconhecida em 1868, quando o biólogo suíço Schwendener (20) demonstrou tratar-se não de uma entidade vegetal, mas de uma simbiose complexa de alga e fungo.

Na maior parte dos estudos a atenção é voltada para dois grupos de substâncias: (i) os chamados ácidos liquênicos e (ii) os constituintes carboidratados solúveis na água, que formam a maior parte dos constituintes sólidos no líquen (20). O exame científico pioneiro do material foi registrado por Berzelius em 1915 (12) que isolou um polissacarídeo do líquen *Cetraria islandica* (musgo da Islândia) através de precipitação por resfriamento de um extrato aquoso quente. Liquenana, assim isolada, foi mais tarde purificada via complexo cúprico insolúvel formado com solução de Fehling (16). Sua estrutura é de um polímero linear de β -D-glucose contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:7 (16,52).

A mistura polissacarídica obtida do sobrenadante por resfriamento do extrato aquoso quente, acima citado, foi

originalmente chamada isoliquenana por Meyer & Gürtler (53). Mais tarde, porém Chanda et al. (16) aplicaram este nome ao componente α -D-glucopiranana que foi purificado via precipitação fracional do complexo cúprico solúvel em água usando acetona. Neste estudo foi demonstrado que a isoliquenana é composta, de fato, somente de resíduos de D-glucose em ligações α -glicosídicas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação molar de 60:40, embora Peat et al. (60) mais tarde sugeriram uma relação de 55:45. O processo de fracionamento empregado por Chanda et al. (16) presumivelmente separou liquenana de um componente contendo manose e galactose que já havia sido detectado por Ulander & Tollens em 1906 (73). Em adição à manose e galactose, Buston & Chambers (15) sugeriram a presença de uma hemicelulose em virtude da presença de ácido galacturônico, contudo, a presença de ácido urônico na caracterização estrutural da molécula não foi ainda confirmada.

Pela remoção da liquenana (β -glucana) através de precipitação em água fria e tratamento subsequente do sobrenadante com solução de Fehling, Karrer e Joos (43) observaram a formação de um complexo cúprico insolúvel contendo manose, galactose e glucose numa relação molar de 21:35:44. Tal observação sugere uma co-precipitação, como complexo cúprico, de uma galactomanana com liquenana remanescente. Contudo, um componente heteropolimérico de *C. islandica* não foi isolado num estado puro. O único achado sobre os componentes de sua possível estrutura molecular foi sugerido por Granichstädten e Percival (32) que, por tratamento de um extrato alcalino com solução de Fehling, obtiveram um precipitado consistindo principalmente de glucana. Este estava presente porque o ex-

trato alcalino acima não foi submetido ao método usual de dissolução pelo calor seguido por precipitação a frio. Mesmo assim uma pequena proporção de heteropolissacarídeo estava presente sendo constituído por unidades terminais não redutoras de galactopiranosose.

Mais tarde Gorin e Iacomini (27) mostraram ser o heteropolissacarídeo de *C. islandica* uma galactomanana, cuja estrutura foi comparada com aquela do líquen *Ramalina usnea* (coletado de ramos de pereira, perto de Quatro-Barras, Panamá). A α -glucana de *R. usnea* foi também investigada. Tanto *C. islandica* como *R. usnea* são líquens com uma forma de crescimento fruticoso e micossimbionte ascomiceto, contendo galactomananas com estruturas diferentes daquelas previamente reconhecidas. Os heteropolissacarídeos são relacionados àqueles das mananas e polissacarídeos contendo manose, encontrados na parede celular da maioria dos fungos ascomicetos, desde que eles contêm unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 6) nas cadeias principais (23). Por outro lado heteropolissacarídeos de fungos basidiomicetos contêm resíduos α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 3) nas cadeias principais (23).

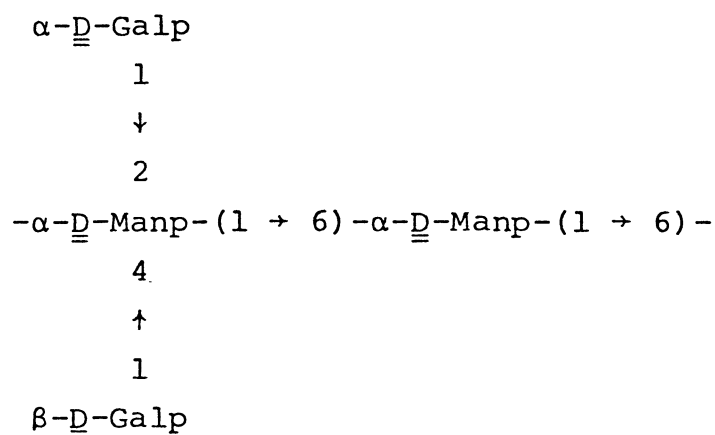
O heteropolissacarídeo de *C. islandica*, previamente tratado com uma celulase obtida de *Aspergillus niger*, apresentou após hidrólise ácida total manose, galactose e glucose (esta última em proporção bastante diminuída) numa relação molar de 49:45:6. Após hidrólise ácida parcial do referido heteropolissacarídeo, foi obtido um polímero contendo manose, galactose e glucose numa relação molar de 74:21:5. Seu espectro de ^{13}C -n.m.r. lembrou aquele de uma estrutura (1 \rightarrow 6)-

substituída α -manopiranana desde que tinha sinais principais em δ 101,0; 72,5 (2 sinais); 71,6; 68,5 e 67,5 (25). Tendo então em vista que o polissacarídeo ácido degradado contém principalmente ligações na configuração α , de acordo com o espectro de ^{13}C -n.m.r. e uma rotação específica positiva relativamente alta de $+51^\circ$, próximo ao valor de $+88^\circ$ relatado para a α -D-manopiranana da levedura de panificação (37), os resíduos manosil devem ter a configuração D. As unidades galactosil também têm esta configuração desde que elas foram oxidadas pela galactose oxidase (3).

Convém aqui citar para termos de comparação a rotação específica de -78° para a β -D-manopiranana isolada de *Rhodotoula glutinis* (26).

Pelos dados anteriormente citados e pelos obtidos em análises de metilação, se pode sugerir que a galactomanana de *C. islandica* contém uma alta proporção de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 6) na cadeia principal. Estas unidades são em parte 2,4-di-O-substituídas por unidades D-galactopiranosil. De acordo com o espectro de ^{13}C -n.m.r. que contém um sinal de C-1 em campo baixo em δ 104,5; as unidades D-galactopiranosil, ligadas (1 \rightarrow 4) aos resíduos α -D-manopiranosil devem ter a configuração β (35). Também consistente com isto é a presença de um sinal típico de C-5 em δ 77,0 (29). Um outro sinal de C-1 em δ 102,7 sugeriu unidades α -D-galactopiranosil substituindo as posições 2 de uma cadeia principal com ligações (1 \rightarrow 6)- α -D-manopiranosil (Estrutura 1) como na galactomanana de *Saccharomyces octosporus* (29). Em concordância com estes dados, acetólise parcial, que ataca preferencialmente as ligações de cadeia principal (1 \rightarrow 6) α -D-

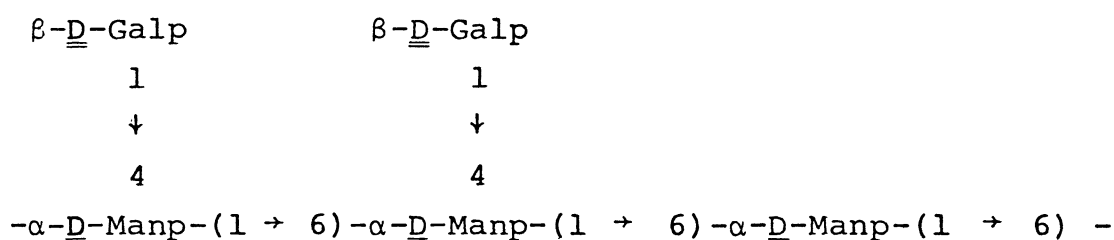
manopiranosil e resíduos β -D-galactopiranosil, forneceu 2-O- α -D-galactopiranosil-D-manose, que foi isolado.



1

Um polissacarídeo de *R. usnea* (27) dando um complexo cúprico insolúvel com solução de Fehling, continha galactose, manose e glucose numa relação molar de 43:53:3 e uma rotação específica de $+63^{\circ}$. As unidades manosil e galactosil existem como D-enantiômeros. Análises de metilação mostraram a presença de unidades terminais não redutoras de galactopiranosose (40%), manopiranosose (2%), galactofuranose (3%) e unidades 6-O- (19%) e 4,6-di-O-substituídas (37%) de manopiranosose. Hidrólise ácida parcial do polissacarídeo de *R. usnea* forneceu um núcleo resistente, tendo uma rotação específica de $+61^{\circ}$, com 17% de galactose e 83% de manose. Esse núcleo, em dados obtidos em análises de metilação consistia principalmente de unidades manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 6) (66%), com unidades terminais não redutoras de manopiranosose (11%), galactopiranosose (14%) e unidades de manopiranosose 4,6- (7%) e 2,6- (2%)-di-O-substituídas.

O espectro de ^{13}C -n.m.r. desta galactomanana indicou a presença de unidades galactopiranosil na configuração β (C - 1, δ 104,8). De acordo com os dados acima, estes estão ligados (1 \rightarrow 4) à cadeia principal e, dessa forma, uma alta proporção de uma estrutura como a 2 está presente, com substituintes em aproximadamente duas de cada três unidades em ligação (1 \rightarrow 6) de cadeia principal α -D-manopiranosil. Assim, as galactomananas de *C. islandica* e *R. usnea*, ambas com formas fruticulosas de



-2

crescimento, apresentam estruturas diferentes mas quimicamente relacionadas em termos das cadeias principais e das estruturas das cadeias laterais. Se a maioria dos líquens que têm micossimbionte ascomiceto contem tais galactomananas é de significância. Também as fontes destes e outros polissacarídeos são de interesse, se eles se originam do simbiote fungo ou alga de cada líquen.

Heteropolissacarídeos de outros líquens como *Cladonia alpestris* (musgo das renas) e *Evernia prunastri* já foram isolados. Aspinall et al. em 1955 (5) obtiveram do musgo das renas, via precipitação com solução de Fehling, produtos contendo galactose, manose e glucose. Embora os dados de metilação aparentemente diferiram daqueles obtidos de preparações de *C. islandica*, as técnicas analíticas usadas em 1955 não impe-

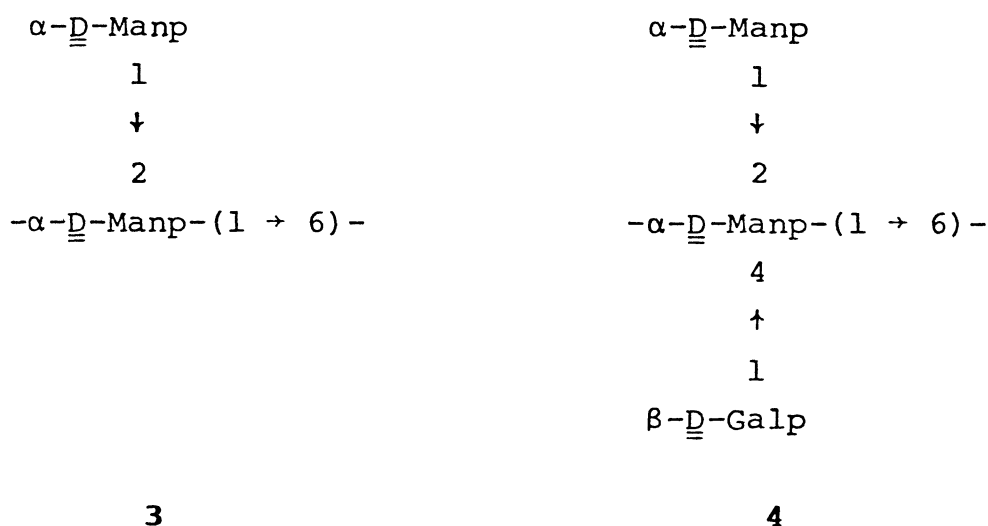
dem semelhanças na estrutura química, considerando que estas técnicas não eram sensíveis o suficiente para permitir uma de terminação detalhada da estrutura química.

Outro heteropolissacarídeo obtido de *E. prunastri* (54) contém galactose, manose e ácido glucurônico. As únicas possíveis semelhanças à estrutura l altamente ramificada é a presença de altas proporções de terminais não redutores de galactopiranose (36%), manopiranose (11%) e resíduos tri-O-substituídos de manopiranosil, cujas posições de substituição não foram confirmadas. Em vista destes resultados incertos, heteropolissacarídeos de outros líquens, tendo um ascomiceto como micossimbionte, foram investigados.

Uma comparação foi conduzida sobre as estruturas químicas de componentes polissacarídicos de três espécies de líquens do gênero *Cladonia* (42). Duas espécies que têm formas de crescimento quase indistinguíveis, *C. alpestris* (Saskatchewan Central-Canadá) e *C. confusa* (Sul do Brasil) apresentaram traços de nigerana, um polissacarídeo insolúvel na água fria, isolado por precipitação após extração aquosa quente. A estrutura da nigerana consiste predominantemente de unidades repetidas α -D-glucopiranosil em ligações alternadas 3- e 4- (6, 7). Os líquens residuais foram extraídos com hidróxido de potássio aquoso a quente e os extratos tratados com solução de Fehling formaram complexos cúpricos insolúveis. Após remoção do cobre, galactomananas quase puras foram obtidas, que não eram idênticas mas estruturalmente relacionadas.

Análises baseadas na composição monossacarídica, hidrólise parcial, rotação específica, dados de metilação e acetólise parcial mostraram que cada galactomanana continha uma

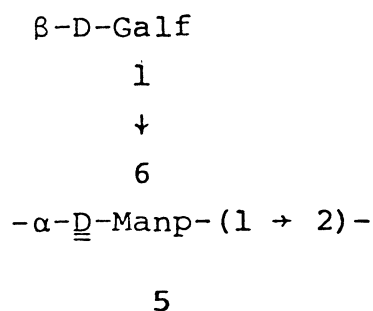
cadeia principal composta de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 6). Algumas destas eram 2-O-substituídas por resíduos α -D-manopiranosil (Estrutura 3) ou 4-O-substituídas por resíduos β -D-galactopiranosil e em alguns casos 2,4-di-O-substituídas (Estrutura 4).



Embora algumas diferenças estruturais foram encontradas, elas se tornaram mais aparentes na comparação das regiões de C-1 dos espectros de ^{13}C -n.m.r. Estes diferiram daqueles das galactomananas de *C. islandica* e *R. usnea* previamente investigadas (27). No caso do heteropolissacarídeo de *C. alpestris* (Fração-A), uma estrutura complexa foi refletida no seu espectro de ^{13}C -n.m.r. que continha 8 sinais na região de C-1, cada um deles representando ao menos uma estrutura diferente. O espectro de ^{13}C -n.m.r. do heteropolissacarídeo de *C. confusa* (Fração-C), mostrou que este era estruturalmente diferente da Fração-A, o componente correspondente de *C. alpestris*. Embora o espectro contivesse sinais comuns em δ 104,9; 103,7 e 100,0; suas respectivas proporções eram diferentes. Hidrólise parcial da Fração-C forneceu um polissacarídeo cujo espectro

de ^{13}C -n.m.r. era semelhante ao material correspondente obtido da Fração-A de *C. alpestris*. *C. amaurocraea* continha dois polissacarídeos, extraídos com hidróxido de potássio aquoso a quente, e dando complexos cúpricos insolúveis com solução de Fehling. Tratamento dos complexos cúpricos com resina originou o polissacarídeo insolúvel na água, pustulana, uma β -D-glucopiranosana linear em ligações (1 \rightarrow 6) previamente encontrada como um componente de outros líquens (49, 57) e uma galactomanana solúvel na água e contaminada com pustulana. A galactomanana embora tendo uma estrutura geral já descrita anteriormente para os dois outros líquens do gênero *Cladonia*, tinha um espectro de ^{13}C -n.m.r. cuja região de C-1 diferiu de todos aqueles previamente determinados com a possível exceção daquele da galactomanana de *R. usnea* (27).

Componentes polissacarídicos estruturalmente diferentes de *C. alpestris* e *C. confusa* foram isolados em rendimento baixo dos sobrenadantes correspondentes aos já citados precipitados obtidos com solução de Fehling. Aquele de *C. alpestris* continha galactose, manose e alguma glucose e uma alta proporção de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 2), aparentemente na forma de uma cadeia substituída nas posições -6 por unidades β -D-galactofuranosil (Estrutura 5). Seu espectro de



^{13}C -n.m.r. tinha uma região de C-1 complexa. Virtualmente ne-

nhum polissacarídeo estava presente no sobrenadante do passo de Fehling para o líquen *C. amaurocraea*.

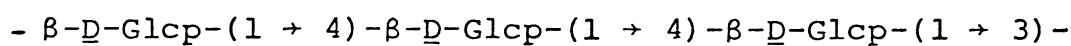
Glucanas de líquens

Os líquens geralmente possuem um componente galactomanana e uma ou duas glucanas.

Desde os estudos iniciais de Berzelius em 1815 (12) o curso de análises dos componentes polissacarídicos de diversos líquens vêm experimentando novos processos de fracionamento para a obtenção de polissacarídeos puros. Estes métodos incluem, por exemplo, precipitação por complexação cúprica insolúvel em água usando solução de Fehling (31) e precipitação com hidróxido de cetiltrimetilamonio (66).

β -D-Glucanas de líquens

Entre as β -glucanas comuns em líquens temos a já anteriormente citada liquenana, uma β -D-glucana linear com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:7 (16, 52) como na estrutura preponderante 6. Liquenana constitui aproximada-



6

mente 10% do líquen *C. islandica* (musgo da Islândia) (23) e está presente também em outras espécies liquênicas, incluindo *Usnea rubescens* (56), *Alectoria sulcata* (Lev.) Nyl. e *Alectoria sarmentosa* (Ach.) Ach (71) e foi obtida destas três espécies por precipitação a frio após extração aquosa quente.

O espectro de ^{13}C -n.m.r. da liquenana, obtido em campo magnético alto (9), correspondia a uma sequência repetitiva (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 3), dando quinze sinais em vez dos dezoito esperados, por causa da superposição de sinais. A presença de duas ligações consecutivas (1 \rightarrow 3) não é provável, pois não há nenhuma separação de sinais associado com ligações (1 \rightarrow 3) em contraste com aqueles associados com ligações (1 \rightarrow 4).

E. prunastri possui uma β -D-glucana estruturalmente diferente, com ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação de 3:1, precipitada por hidróxido de cetiltrimetilamonio da fração solúvel em água fria (71).

Uma β -D-glucopirranana com ligações (1 \rightarrow 6) parcialmente acetilada, foi extraída com água quente do líquen *Gyrophora esculenta* Miyoshi e purificada pelo método de congelamento e degelo. O grau e posição (s) de substituição não tem sido ainda determinado (68). Uma glucana semelhante também foi encontrada em *Lasallia pensylvanica* (56) e *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano (68). A glucana desacetilada forneceu um espectro de ^{13}C -n.m.r. (63) semelhante àquele da pustulana (11), uma β -glucana linear com ligações (1 \rightarrow 6) obtida dos líquens *Umbilicaria pustulata* (L) Hoffm. (49) e *Umbilicaria hirsuta* (Sw. ex. Wester) Ach. (57), por precipitação a frio após extração aquosa quente. Glucanas tipo pustulana O-acetiladas foram obtidas de outras espécies do gênero *Umbilicaria* como *U. angulata*, *U. caroliniana* e *U. polyphylla* (57), também por precipitação a frio após extração aquosa quente.

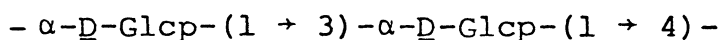
Cabe aqui citar a correlação taxonomicamente íntima dos gêneros *Gyrophora*, *Lasallia* e *Umbilicaria*, todos pertencentes à família Gyrophoraceae e com a ocorrência comum e

característica da pustulana (57). Assim, os polissacarídeos de líquens podem ser usados em alguma extensão como compostos de referência para a classificação quimotaxonomica dos líquens (70).

α -Glucanas de líquens

Entre as α -glucanas comuns em líquens temos a já citada isoliquenana, uma α -D-glucana contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação de 11:9 (60). Tal componente está presente em *C. islandica* (16), *Alectoria sulcata* (Lev.) Nyl., e *Alectoria sarmentosa* (Ach.) Ach (71).

Parmelia caperata (L.) Ach. forneceu uma α -D-glucopirranana insolúvel em água fria tendo resíduos em ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) em proporções equimoleculares. Como não havia ligações sucessivas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4), a glucana é estruturalmente semelhante à nigerana (6, 7), (unidade repetitiva 7). Glu-



7

canas tipo nigerana também estão presentes em pequena quantidade em quatro líquens do gênero *Cladonia*, *C. crispata*, *C. mitis*; *C. rangiferina* subsp. *grisea*, e *C. squamosa* (56).

A partir de análises químicas (76), a glucana de *Stereocaulon japonicum* aparentemente tinha ligações α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4) numa relação de 3:1, mas demonstrou-se ser esta relação de 2:1 por um estudo de ^{13}C -n.m.r. (77). Esta técnica foi útil por mostrar que as α -D-glucanas obtidas de *Sphaerophorus globosus* e *Acroscyphus sphaerophoroïdes* tinham ligações

(1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação de 2:3, com menos de 6% de ligações (1 \rightarrow 6), não ficando claro este último valor somente por análises de metilação (71).

Uma α -D-glucana de *E. prunastri*, que permaneceu no líquido sobrenadante, após precipitação com hidróxido de cetiltrimetilamonio continha ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação de \sim 3:2, relembrando isoliquenana (71).

Uma glucana, precipitada pelo frio após uma extração aquosa quente, foi isolada do líquen *R. usnea* (27). As análises de metilação mostraram que a glucana de *R. usnea* contem ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) numa relação de 62:38. Seu espectro de ^{13}C -n.m.r. mostrou principalmente sinais de C-1 em δ 102,8 e 101,9 típicos do componente principal α -D-glucopiranana que aparece no sobrenadante (35). Um sinal menor de C-1 em δ 104,8 corresponde a um sinal de um componente galactomanana ao invés da liquenana que daria também outros sinais em δ 105,1 e 106,0. O produto insolúvel estava presente numa proporção muito pequena, pois seu espectro de ^{13}C -n.m.r. não continha um sinal típico de C-1 em δ 101,3. O sobrenadante dessa precipitação a frio, acima descrita, continha uma α -D-glucana e uma galactomanana que foram fracionadas usando solução de Fehling. A α -D-glucana solúvel foi isolada do sobrenadante do passo de Fehling e tinha uma rotação específica de $+243^\circ$. Seu espectro de ^{13}C -n.m.r. mostrou semelhanças àquele da isoliquenana* embora um sinal maior em δ 101,0 e outro menor em δ 79,3 indi-

* O espectro de ^{13}C -n.m.r. da isoliquenana é de interesse desde que a relação de sinais de O-substituídos C-3 e C-4 em δ 82,1; 81,9 e 79,3 respectivamente é 66:34, indicando uma proporção maior de resíduos 3-O-substituídos do que os valores de 60% (16) e 55% (60) que foram previamente citados.

cassem algumas diferenças estruturais (as proporções das ligações (1 → 4) são menores). Análises de metilação indicaram que as ligações (1 → 3) e (1 → 4) estavam presentes, respectivamente, nas proporções de 69% e 22%, com estrutura repetitiva preponderante como em 8, com três ligações consecutivas (1 → 3) interceptadas com ligações isoladas (1 → 4). Uma pequena

$\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 4)\text{-}$

8

na proporção de ramificações estava presente, com unidades terminais não redutoras (4%); 3,4- (3%) e 2,3 - di-O-substituídas (2%). As ligações (1 → 3) e (1 → 4) da glucana estão distribuídas regularmente ao longo da cadeia linear, tendo em vista os dados da degradação de Smith fornecidos a seguir. O poliol resultante foi submetido a uma hidrólise ácida branda e o produto obtido forneceu dois pontos principais por c.p. A mistura foi fracionada por cromatografia em coluna de celulose, dando, na ordem de emergência, três produtos numa relação de 17:30:4. O componente principal tinha uma rotação específica de +177°, e por hidrólise deu glucose e eritritol. Análises de metilação mostraram que as unidades glucopiranosil estavam presentes como terminais não redutores e unidades 3-O-substituídas numa relação de 1:2. Estes dados são consistentes com uma estrutura O-α-D-glucopiranosil (1 → 3)-O-α-D-glucopiranosil-(1 → 3)-O-α-D-glucopiranosil-(1 → 2)-D-eritritol (Estrutura 9). Correspondente com esta estrutura,

$\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1} \rightarrow 2)\text{-D-eritritol}$

que tem três unidades de glucopiranosil , o espectro de ^{13}C -n.m.r. contém três sinais de C-1 em δ 100,9; 100,8 e 99,5; além de três sinais correspondentes a carbonos O-substituídos em δ 82,2; 82,0 e 80,3 e cinco sinais correspondentes a grupos hidróxílicos primários não substituídos em δ 64,3; 62,4; 62,1 (2 sinais) e 61,5. O outro produto da degradação de Smith pareceu ser um derivado O-hidroxietilideno de 9 e dessa forma, a glucana original teria uma estrutura principal repetida 8, lembrando a estrutura postulada para a glucana já isolada do líquen *Stereocaulon japonicum* (76).

Uma glucana precipitada após congelamento e degelo de uma extração aquosa quente de *Cladonia alpestris* (42), continha glucose (91%), manose (5%) e galactose (3%) e foi homogênea por ultracentrifugação, tendo um coeficiente de sedimentação de 2.1 S. A glucana tinha a configuração α desde que seu espectro ^{13}C -n.m.r. continha dois sinais de C-1 em campo alto em δ 100,8 e 101,8 (35). Após metilação os produtos foram convertidos a acetatos de O-metilglucitol e analisados por g.l.c.-m.s., usando uma coluna capilar revestida com OV-225—OV-17 (3:1) onde derivados 2,3,6- e 2,4,6- foram detectados. Suas proporções relativas indicaram que as unidades glucopiranosil ligadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) estavam presentes numa relação de 1:1. Estas estavam distribuídas regularmente ao longo de uma cadeia linear desde que uma degradação de Smith, incorporando condições hidrolíticas suaves, deu por c.p. um único ponto correspondente ao 2-O- α -D-glucopiranosil-D-eritritol , como na glucana de *Aspergillus niger* (nigerana) (6, 7), Estrutura 7. Como no líquen *C. alpestris*, uma α -D-glucana insolúvel na água foi obtida por congelamento de um extrato aquoso

quente do líquen *Cladonia confusa* (42). A glucana resultante tinha uma rotação específica de $+189^{\circ}$, e deu um espectro de ^{13}C -n.m.r. semelhante àquele da α -glucana de *C.alpestris*. Resíduos 3-O- e 4-O-substituídos também estavam presentes em uma relação de 53:47 (análises de metilação) e estavam distribuídos regularmente ao longo de uma cadeia linear como evidenciado pela formação de 2-O- α -D-glucopiranosil-D-eritritol através de uma degradação de Smith. A glucana tinha uma estrutura semelhante àquela da nigerana (6,7), Estrutura 7.

É de interesse citar que várias glucanas isoladas de líquen têm se mostrado ativas contra sarcomas sólidos 180 implantados subcutâneamente em ratos.

O princípio ativo isolado em um estado puro do líquen *Gyrophora esculenta* Miyoshi (68), uma glucana tipo pustulana contendo ligações α -D-(1 \rightarrow 6), mas diferindo desta por conter 4-10% de grupos acetil situados em O-3 (74), mostrou efeito antitumorígeno ativo. O grau de inibição foi de 99,1% e uma regressão completa do tumor ocorreu em oito dos dez ratos testados (21). Desacetilação abaixou a atividade, e troca de grupos O-acetil por grupos O-metil da glucana, forneceu produtos inativos (74).

De modo semelhante, glucanas parcialmente acetiladas têm sido isoladas dos líquens *Lassalia papulosa* (Ach.) L. (68,74) e *Umbilicaria* sp (57), com grau de inibição de 98,4% (68) e 97% (57) e uma regressão completa do tumor em nove (68) e seis (57) dos dez ratos testados, respectivamente. Liquenana e isoliquenana isolados do líquen *C. islandica* (L.) Ach. var. *orientalis* Asahina mostraram graus de inibição de 100% e 99,6%, respectivamente (21).

Embora poucos trabalhos têm sido feitos sobre a distribuição de polissacarídeos liquênicos, aqueles do tipo liquenana ocorrem em muitos líquens, com ou sem polissacarídeos tipo isoliquenina (21).

O mecanismo de ação antineoplásica destes polissacarídeos é considerada como sendo dependente da reação do hospedeiro, isto é, apresentarem seus efeitos mediados pelo hospedeiro, pois a inibição do tumor só se torna perceptível no grupo tratado depois da segunda semana. E nenhuma das amostras ativas se mostrou diretamente citotóxica (21,74).

Convém também citar o efeito antineoplásico sobre sarcoma-180 implantado em ratos obtido de extratos de alguns fungos basidiomicetos (21).

Como se pode observar, os líquens são sugeridos como uma fonte promissora de polissacarídeos com este tipo de efeito antineoplásico (21) e fica portanto justificado seu estudo mais detalhado em termos de isolamento, purificação e análise química estrutural para futuros testes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Métodos gerais: as rotações ópticas foram obtidas com polarímetro automático Perkin-Elmer, modelo 141 a 25°. Para estas determinações os polissacarídeos e o oligossacarídeo foram solubilizados em água.

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório, modelo Büchi, à vácuo e em banho de água na temperatura média de 50°, com excessão dos produtos de formólise de amostras metiladas, onde a temperatura do banho de água foi de 30°.

As medidas de pH foram usualmente tomadas à temperatura ambiente em aparelho Clamann - Gralmert MV 85 (Dresden).

As determinações espectrofotométricas foram efetuadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A, para a região do espectro visível.

O componente heteropolissacarídico foi submetido a eletroforese em fitas de acetato de celulose (Cellogel), utilizando tampão barbital 0,04 M; pH 8,6 e tampão borato de sódio 0,05 M; pH 8,6. A corrida foi de 80 minutos, com 200 V e 1,5 mA por fita, em equipamento Fanem Ltda., com câmara de imersão da Chametron. O componente β -D-glucana também foi examinado por eletroforese utilizando tampão borato de sódio 0,05 M; pH 8,6; nas mesmas condições já citadas. Para visualizar proteína

utilizou-se o sistema com Coomassie brilliant blue R250 (69) e para visualizar glicoproteína empregou-se o reativo de Schiff (62).

A cromatografia líquida-gasosa (g.l.c.) foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detector de ionização de chama, usando-se nitrogênio como gás de arraste num fluxo de 37,5 mL/min. A temperatura da câmara de injeção foi de 200^o e do detector 250^o. A seguinte coluna foi empregada: a) coluna de aço inoxidável (200 x 0,15 cm d.i.) empacotada com ECNSS-M a 3% (p/p) sobre "Gas Chrom. Q" de 100-120 mesh. Esta coluna foi utilizada para a determinação quantitativa dos acetatos de alditóis (à temperatura de 180^o ou com programação de temperatura de 130 a 180^o, com variação de 4^o por minuto) e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados (à temperatura de 160^o), sendo seus tempos de retenção (T) relativos ao do xilitol penta-O-acetato e do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol, respectivamente.

As determinações quantitativas dos materiais analisados por g.l.c. foram obtidas de acordo com o método da triangulação, segundo Sawardeker et al. (65).

A cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c.-m.s.) foi realizada com os derivados acetatos de alditóis parcialmente metilados em espectrômetro marca Finnigan, modelo 4000, dotado de um sistema de dados Inco 2300 e equipado com colunas capilares (0,25 mm d.i. x 30 m), revestidas com; b) OV-17; c) DB-210; d) OV-225 — OV-17 (3:1, p/p e 1:3, p/p). Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada dois segundos, desde massa 40 até massa 420. As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50^o, e então, o aparelho foi rapidamente programado (40^o/min)

a 220° (então mantido). O gás de arraste foi o hélio com uma velocidade linear de 22 cm/s. Identificação final dos produtos foi realizada por co-injeção com padrões e as áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

Sobre metilação do heteropolissacarídeo, acetato de 2,3-di-O-metil-xilitol foi identificado como um produto usando a coluna de OV-225 — OV-17 3:1, p/p (coluna d) conduzido a uma ambiguidade desde que o produto acima é idêntico ao isômero 3,4-di-O-metil. Para distinguir entre os dois tipos de substituição, a mistura de aldoses-O-metiladas foi tratada com ácido clorídrico 3% em metanol, a refluxo, por três horas e o produto resultante foi examinado por g.l.c. usando a coluna de DB-210 (coluna c), 50°, rapidamente programada a 200° (então mantido).

Para a análise dos glicosídeos octil-acetilados utilizou-se a seguinte coluna; e) coluna capilar de quartzo (0,32 mm d.i. x 60 m) quimicamente ligada com Durowax-4 (J & W Scientific). As injeções foram feitas diretamente na coluna a 50° e então rapidamente programada (40°/min) até 230° (então mantido). O gás de arraste foi o hidrogênio, com velocidade linear de 80 cm/s. G.l.c.-m.s. foi realizada em espectrômetro Finnigan, modelo 4000 nas mesmas condições já descritas.

As cromatografias em papel (c.p.) foram efetuadas pelos métodos ascendente e descendente, utilizando-se como suporte papel Whatman nº1, com os seguintes sistemas de solvente; f) método ascendente, utilizando benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3, v/v, fase superior). Como visualizador dos açúcares obtidos por hidrólise ácida total (TFA 2 M, 100°, 15 h (2) ou H₂SO₄ 0,5 M, 100°, 18 h, neutralização BaCO₃), (27)

utilizou-se nitrato de prata alcalino (72) ou cloridrato de para-anisidina (40) e suas respectivas migrações foram comparadas aos padrões utilizados de glucose, galactose, manose e xilose. A migração do oligossacarídeo da extração metanol-água 4:1 foi relacionada à da D-galactose (R_{GAL}); g) método descendente, utilizando n-butanol-etanol-água (2:1:1, v/v). Como visualizador dos oligossacarídeos obtidos pela degradação de Smith controlada do heteropolissacarídeo e da β -D-glucana utilizou-se nitrato de prata aquoso 10% e hidróxido de amônia concentrado (1:1, v/v), (59). A revelação foi feita em estufa a 120° e as respectivas migrações foram comparadas ao padrão utilizado de 1-O- β -D-glucopiranosil-D-glicerol (R_{GG}); h) método descendente, utilizado n-butanol-etanol-água (40:11:19, v/v), com o mesmo procedimento de visualização (59) e revelação do sistema g.

A cromatografia em camada delgada (t.l.c.) foi efetuada em placas de sílica gel Merck (20 x 20 cm com 0,25 mm de espessura) com o seguinte sistema de solvente; i) benzeno-etanol-água-ácido acético (200:47:15:1, v/v) e a visualização foi feita por nebulização da placa com solução de metanol-ácido sulfúrico (9:1, v/v), seguindo-se de aquecimento a 100° durante 15 minutos. As migrações dos monossacarídeos obtidos por hidrólise ácida total (TFA 2 M, 100°, 15 h) foram comparadas aos mesmos padrões utilizados no sistema f.

A determinação de açúcar total foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (18); proteínas totais, pelo método do Lowry e colaboradores (51); conteúdo de pentoses do heteropolissacarídeo por uma combinação dos métodos de Albaum e Umbreit (1) e Dische (17) e

nitrogênio total, pelo método de micro-Kjeldahl.. (58).

O ponto de fusão da α,α -D-trealose foi obtido em aparelho HMK 69 - 268-L, usando-se termômetros de Anschütz. Os valores de peso seco dos polissacarídeos foram obtidos com amostras em estufa a 100° até peso constante.

Coleta e preparo do material: o líquen *Cora pavonia* foi coletado na Serra do Mar-Paraná-Estrada da Graciosa, a aproximadamente 1,0 Km do posto de Polícia Florestal em direção a Morretes a uma altitude de 900 metros e situado na encosta do morro, em locais íngremes, onde é difícil o desenvolvimento de plantas superiores. Como seu crescimento é em barrancos e coletâneamente com outras espécies vegetais, como musgos e diversas plantas rasteiras, foi necessário cuidadosa limpeza da superfície liquênica com posterior exposição ao ar e sol, ou em estufa, com ventilação, à temperatura de 60°, para secagem.

Após completamente secos (150 g) foram fragmentados e extraídos a refluxo por duas vezes consecutivas com benzeno - etanol (9:1, v/v; 1,5 L) na temperatura de 70° por três horas. A seguir o material foi filtrado ainda quente.

Isolamento e cristalização da α,α -D-trealose: o resíduo liquênico seco (135,18 g) proveniente da extração benzênica foi a seguir tratado a refluxo com metanol-água (4:1, v/v; 1L) por um período de 3 horas, filtrado a quente, e o filtrado, evaporado a vácuo até secura, foi tratado em solução aquosa com resinas Dowex 50W x 8 (forma H⁺) e Dowex 2 x 8 (forma HCO₃⁻). Filtração seguida por evaporação a vácuo proveu um resíduo de 6,7 g, que correspondeu a 4,4 g% do peso do líquen original.

Foram analisados por c.p. (sistema f) o resíduo solubilizado em água e os seus respectivos produtos após hidrólise ácida total (TFA 2 M, 100°, 15 h).

Do resíduo anterior (3,0 g) foram submetidas ao processo de cristalização em meio etanólico (19) e mantido em "freezer" por vários dias.

Isolamento e purificação dos polissacarídeos

a. Extração aquosa

O líquen (125,16 g) que tinha sido previamente extraído com benzeno-etanol e metanol aquoso foi tratado com água (2 L), pH 7,0 a 100° por oito horas. O resíduo foi filtrado enquanto quente e o processo de extração repetido cinco vezes nas mesmas condições. Os filtrados combinados foram congelados, com posterior degelo à temperatura ambiente, e o material insolúvel não carboidratado que se formou foi centrifugado e separado. O sobrenadante (1 L) obtido foi concentrado a vácuo até 200 mL e continha 5,5 g de polissacarídeo extraído que foi precipitado por adição de excesso de etanol. O produto polissacarídico foi dissolvido em água (200 mL) e adicionado de solução de Fehling (200 mL) com posterior repouso em refrigerador por 24 horas. O precipitado que se formou foi filtrado e lavado sucessivamente com hidróxido de potássio aquoso 2% a frio e metanol. O complexo cúprico foi decomposto por agitação em uma suspensão aquosa de resina Dowex 50W x 8 (forma H⁺) que foi filtrada e o filtrado concentrado para um pequeno volume (10 mL). Adição de excesso de etanol precipitou o heteropolissacarídeo que foi isolado. Este foi redissolvido em água,

reprecipitado com solução de Fehling e dessa forma efetuado seu isolamento. O processo foi repetido por mais três vezes, até que a composição dos açúcares fosse constante.

O sobrenadante da primeira precipitação com solução de Fehling foi neutralizado com ácido acético 2 M, dializado contra água corrente por três dias e então desionizado com resinas Dowex 50W x 8 (forma H^+) e Dowex 2 x 8 (forma HCO_3^-). A solução foi concentrada para um pequeno volume (10 mL), adicionado de excesso de etanol e o polissacarídeo precipitado foi isolado após centrifugação. A preparação demonstrou estar impura desde que quando tratada por solução de Fehling forneceu um novo precipitado. Este foi removido, a glucana isolada, e o processo repetido por mais três vezes para remoção completa de impureza.

b. Extração alcalina

Com finalidade de se obter os componentes polissacarídicos em maior rendimento, o líquen (100 g) foi extraído sucessivamente com benzeno-etanol e metanol aquoso em condições já descritas, e então tratado com hidróxido de potássio aquoso 2% (1 L) a 100° por duas horas. A mistura foi neutralizada com ácido acético 2 M, filtrada a quente, e o filtrado concentrado para um pequeno volume (50 mL) foi adicionado de excesso de etanol. O polissacarídeo precipitado foi isolado por centrifugação e o sobrenadante etanólico (900 mL) foi concentrado (20 mL). O conteúdo do sobrenadante foi então tratado com excesso de etanol e centrifugado. O precipitado apresentou rendimento de 11% do peso do líquen original. Uma alíquota (0,5 g) foi então desionizada com resinas Dowex 50W x 8

(forma H^+) e Dowex 2 x 8 (forma HCO_3^-) e analisada por c.p. (sistema f). O polissacarídeo isolado, como descrito anteriormente, por conter inositol liberado no tratamento com álcali, foi então redissolvido em água para purificação e o processo de precipitação etanólica repetido. O polissacarídeo isolado estava livre de inositol e foi submetido ao processo com solução de Fehling, como já descrito, provendo heteropolissacarídeo e β -D-glucana.

Hidrólise ácida total dos polissacarídeos obtidos das extrações aquosa e alcalina e da α,α -D-trealose: amostras dos polímeros e da α,α -D-trealose (cerca de 3 mg) foram tratadas com os seguintes ácidos, tempos e concentrações: a) TFA 2 M (2 mL) e aquecidas a 100° em média durante 15 horas. Após hidrólise, o excesso de solvente foi removido por evaporação até secura. Os resíduos foram então dissolvidos em água; b) H_2SO_4 0,5 M (1 mL) durante 18 horas a 100° . Após hidrólise, a solução foi neutralizada com carbonato de bário, filtrada por papel e o filtrado evaporado até pequeno volume.

As soluções contendo as amostras hidrolisadas foram cromatografadas em papel (sistema f).

Redução e acetilação dos produtos de hidrólise ácida total: os monossacarídeos obtidos da α,α -D-trealose e dos polissacarídeos hidrolisados foram reduzidos com boroidreto de sódio (67) na temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, com a finalidade de eliminar os cationes sódio, as soluções reduzidas foram tratadas com resina Dowex 50W x 8 (forma H^+), que converteu o sal borato sódio em ácido livre.

As soluções foram, a seguir, filtradas por papel e os filtrados resultantes foram evaporados à secura. O ácido bórico resultante deste tratamento foi evaporado a vácuo como éster volátil borato de metila, por sucessivas evaporações com metanol. Os alditóis foram acetilados, usando-se piridina-anidrido acético (1:1, v/v; 2 mL), (67,75), na temperatura ambiente por 12 horas, quando o processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo picado. A mistura de reação foi transferida para um funil de separação e os açúcares acetilados foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos com ácido sulfúrico 0,5 M e em seguida a solução clorofórmica foi lavada diversas vezes com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro, filtrada por papel, e o solvente evaporado à vácuo. A análise por g.l.c. de cada amostra, na forma de acetatos de alditóis, foi conduzida na coluna a.

Desproteínização do heteropolissacarídeo e β -D-glucana obtidas da extração aquosa: a desproteínização de cada fração foi feita utilizando-se enzimas proteolíticas (subtilisina tipo VII) deixando a mistura em "shaker" por 18 horas a 37°. Repetiu-se essa técnica por mais três vezes. A seguir utilizou-se hidróxido de sódio aquoso 40% num mesmo volume líquido que continha a amostra para se obter concentração final da soda na mistura de 20%, e esta foi deixada por 30 minutos em banho de água fervente. Após o que foi dosado proteína total pelo método de Lowry (51) e não se observou mais sua presença dentro dos limites de sensibilidade do referido método. Após a desproteínização das frações obtidas da extração aquosa foram efetuadas todas as análises a seguir.

Cromatografia em coluna de Sepharose 4B-200 (40,0 x 1,0 cm d.i.) do heteropolissacarídeo: a amostra analisada (6 mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 18 mL/h. Frações de 1 mL do eluato foram coletadas na temperatura ambiente e de cada tubo foi retirada uma alíquota de 0,02 mL para determinação do açúcar total (18). O "dextran blue" (peso molecular médio 2×10^6) foi eluído dessa coluna com água destilada, nos volumes de eluição entre 10-13 mL.

Determinação das formas enantioméricas das unidades que compõem o heteropolissacarídeo: Após hidrólise ácida total do heteropolissacarídeo com TFA 2 M em condições já mencionadas, fucose e galactose foram isoladas da mistura por cromatografia de camada delgada sobre sílica gel como já descrito em métodos gerais.

Determinação enzimática da galactose: para determinação da forma enantiomérica da galactose foi utilizada a enzima galactose oxidase, purificada a partir do meio de cultivo do fungo *Polyporus circinatus* (3). Tubos amostras contendo de 10 a 40 mg do açúcar e uma solução padrão contendo 22,5 mg do açúcar foram incubadas a 30° por 1 hora com o reagente cromogênico peroxidase-o-dianisidina e da enzima galactose oxidase. A absorbância foi determinada a 420 nm.

Determinação enzimática da fucose: a L-fucose desidrogenase obtida do meio de cultivo do fungo *Pullularia pullulans* foi utilizada para a determinação da forma enantiomérica da fucose, em virtude desta enzima ser específica para L-fucose e L-galactose(34).

Tubos amostras contendo de 5 a 20 mg do açúcar e uma solução padrão de L-fucose contendo 15 mg do açúcar foram incubadas a 30^o por 1 hora com 50 mM de tampão glicina / NaOH 0,1 M, pH 10,0; 3 mM de NAD⁺ e 0,1 unidades de enzima purificada. A reação foi acompanhada em espectrômetro Beckman - DB , termostatizado a 30^o no comprimento de onda de 340 nm.. Uma amostra de D-galactose também foi testada e nenhuma atividade foi observada que permitisse supor a presença de L-galactose.

Derivatização e preparação das amostras monossacarídicas (preparação dos 2-octil-glicosídeos acetilados), e exame por g.l.c.-m.s. para a determinação das formas enantioméricas: Na ausência de enzimas específicas e considerando as pequenas quantidades disponíveis, foi necessário converter a aldose a um derivado glicosídico de um álcool quiral que se torna passível para exame em g.l.c.-m.s.

O heteropolissacarídeo de *Cora pavonia* (25 mg) foi hidrolisado com ácido sulfúrico 0,5 M em condições já mencionadas. O hidrolisado foi fracionado em uma coluna de celulose usando uma mistura de n-butanol-água 19:1 (v/v) que eluiu frações contendo ramnose e fucose e depois fucose e xilose. Uma mistura de 8:1 originou frações contendo respectivamente xilose e manose, manose, e glucose. Uma mistura de 4:1 proveu galactose. Padrões de monossacarídeos e misturas obtidas por fracionamento do polissacarídeo hidrolisado foram derivatizadas de acordo com o método de Leontein et al. (46) usando (-)-2-octanol (ao invés do (+)-isômero) contendo um traço de ácido trifluoracético e mantido a 130^o. A mistura foi contida em um tubo fechado que foi imerso em um banho de óleo de

silicone com temperatura controlada e agitado com uma barra magnética. Os resultantes octil-glicosídeos foram então acetilados e analisados por g.l.c. (coluna e). G.l.c.-m.s. dos octil-glicosídeos acetilados foi realizada em espectrômetro marca Finnigan modelo 4000. As condições de acetilação e g.l.c.-m.s. já foram descritas anteriormente.

Metilação do heteropolissacarídeo: o heteropolissacarídeo desproteinizado (20 mg) foi tratado com boroidreto de sódio, à temperatura ambiente durante 15 horas. Após redução o meio alcalino foi neutralizado com ácido acético 2 M, na temperatura entre 0 - 2° e dialisado contra água corrente durante 24 horas. A fração não dialisável teve seu volume reduzido (3 mL) e foi tratada com dimetilsulfato (5,0 mL) em solução alcalina aquosa (NaOH 40%, p/v, 10,0 mL), segundo processo descrito por Haworth (36,39), sob agitação vigorosa e constante na temperatura ambiente (20 - 25°), por um período de 24 horas. Durante o processo acrescentou-se acetona ao sistema (2 mL) contendo os polissacarídeos parcialmente metilados, seguido de neutralização com ácido acético aquoso (50%, v/v) na temperatura entre 0 - 2°. Os sais foram removidos por diálise contra água corrente por 48 horas e, finalmente foi concentrada a vácuo (3 mL). Esse processo foi repetido por mais duas vezes. No final desta etapa de metilação o heteropolissacarídeo parcialmente metilado foi evaporado a vácuo até securo e submetido a novo processo de metilação com dimetilformamida (5,0 mL), óxido de prata (200 mg) e iodeto de metila (5,0 mL), sob agitação vigorosa e constante na temperatura ambiente (20 - 25°) e na ausência de luz, segundo método de Purdie modificado por

Kuhn et al. (39,45). O processo foi contínuo por três dias com uma adição diária dos dois últimos reagentes. A seguir acrescentou-se clorofórmio em excesso à mistura reativa e filtrou-se por papel. O filtrado clorofórmico foi evaporado à secura e o polissacarídeo permetilado foi convertido a acetato de alditol parcialmente metilado, como será descrito no último item dessa página.

Metilação da glucana: a glucana desproteïnizada (10 mg) foi reduzida com boroidreto de sódio, e tratada com dimetilsulfato (3,0 mL) em solução alcalina aquosa (NaOH 40%, p/v, 6,0 mL), segundo processo descrito por Haworth . Em seguida foi tratada com dimetilformamida (3,0 mL), óxido de prata (100 mg) e iodeto de metila (5,0 mL), segundo método de Purdie modificado por Kuhn et al. Em ambos os métodos de metilação a sequência do processo é a mesma daquela descrita anteriormente para o heteropolissacarídeo.

Metilação da α,α -D-trealose: a α,α -D-trealose (20 mg) foi metilada segundo método de Purdie modificado por Kuhn et al. nas condições descritas no item metilação do heteropolissacarídeo.

Análise dos produtos de hidrólise ácida das amostras metiladas: amostras metiladas (5 mg) como já descrito no item anterior foram submetidas a hidrólise com uma solução aquosa de ácido fórmico a 85% (v/v) em tubos de hidrólise e mantida a 100° durante 2 horas. O excesso de ácido fórmico foi removido por evaporação (sob pressão reduzida) a 40° e os resíduos foram submetidos a nova hidrólise ácida com ácido sulfúrico 0,25 M

a 100° por 16 horas. O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado na forma de sal de bário, após processo de neutralização com carbonato de bário, filtrado, e o filtrado tratado com resina trocadora de íons Dowex 50W x 8 (forma H⁺) (14,47). Os produtos de hidrólise foram a seguir reduzidos com boroidreto de sódio por 3 horas na temperatura ambiente, sendo o agente redutor destruído por adições cuidadosas de ácido acético aquoso 2 M.

Os cationes sódio foram eliminados da preparação por tratamento com resina trocadora de íons Dowex 50W x 8 (forma H⁺) e o ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de metila por co-destilação com metanol. A acetilação dos alditóis parcialmente metilados foi realizada com anidrido acético-piridina (1:1, v/v). Os produtos metilados na forma de acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio, em funil de separação e analisados por g.l.c. (colunas a,b,c,d).

Determinação do consumo de meta-periodato e ácido fórmico liberado do heteropolissacarídeo: o heteropolissacarídeo, previamente desproteínizado (20 mg) foi dissolvido em água (25 mL) e oxidado com meta-periodato de sódio 0,01 M (25 mL) na temperatura entre 0 - 2°, durante 72 horas na ausência de luz. Em paralelo foi feito um branco nas mesmas condições. A diferentes intervalos de tempo foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução oxidante e do branco para análise do consumo de periodato pelo método do tiossulfato de sódio, usando solução aquosa de amido a 1 g % como indicador (4,38,55).

Pelo consumo de periodato, em diferentes intervalos de tempo, expresso em moles de meta-periodato de sódio consumido por mol de açúcar anidro, obtem-se um gráfico em que o valor real do periodato requerido para a completa oxidação do polissacarídeo é obtido extrapolando a curva para o tempo zero.

O ácido fórmico liberado por mol de açúcar anidro (8) no sistema de oxidação após 72 horas foi determinado em atmosfera de nitrogênio por titulação de alíquotas de 5 mL, com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01 M, usando solução de fenolftaleína a 1 g % como indicador.

Degradação de Smith (hidr.suave) do componente heteropolissacarídico e da β -D-glucana: uma amostra do heteropolissacarídeo e da β -D-glucana (20 mg de cada) foram oxidadas com meta-periodato de sódio 0,05 M (50,0 mL) durante 72 horas entre 0 e 2° na ausência de luz. O excesso do agente oxidante foi destruído pela adição de etileno glicol (3,0 mL) e a solução oxidada foi dializada contra água corrente por 24 horas. Após diálise, a solução contendo o polialdeído foi concentrada a vácuo até pequeno volume (5 mL) e tratada com boroidreto de sódio na temperatura ambiente por 12 horas. O excesso de agente redutor foi decomposto por adições cuidadosas de ácido acético 2 M até pH 6,0 na temperatura de 0 - 2°. O produto da redução foi então dializado contra água corrente por 24 horas.

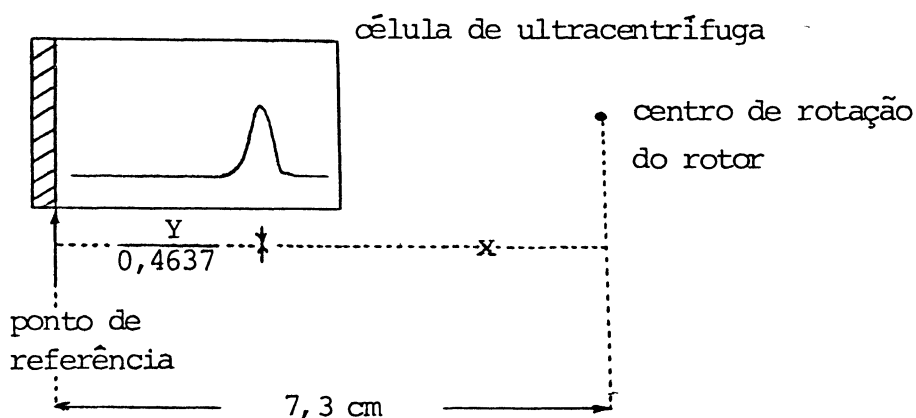
A fração não dialisável foi concentrada a um pequeno volume (3,0 mL) e o poliol sofreu hidrólise parcial em pH 2,0 (o pH foi ajustado com H_2SO_4 3 M), durante 40 minutos na tem-

peratura de 100° . Após isso o meio ácido foi neutralizado com carbonato de bário e filtrado por papel. O filtrado foi tratado com resinas Dowex 50W x 8 (forma H^{+}) e Dowex 2 x 8 (forma HCO_3^{-}) e após filtração foi concentrado a um pequeno volume e cromatografado em papel (sistemas b e c) (27).

Ultracentrifugação dos polissacarídeos de *Cora pavonia*: os coeficientes de sedimentação dos polissacarídeos foram determinados em uma solução aquosa de 0,45% em NaOH 0,1 M (2 mL) 20° , a 50.000-52.732 r.p.m., em uma ultracentrífuga analítica modelo E Beckman.

As seguintes etapas foram necessárias para o cálculo dos coeficientes de sedimentação dos polímeros:

- a) medir a distância Y entre a ordenada máxima de cada pico e a borda do eixo (ponto de referência) que, neste caso, estava a 7,3 cm do centro de rotação do rotor. A operação foi repetida para cada fotografia obtida.



- b) as tomadas fotográficas foram feitas, neste caso, a intervalos de 4 minutos após a velocidade atingir 52.732 r.p.m., do rotor contendo a célula a um prato de vidro. O prato de vidro representa a célula, mas com um fator de ampliação (M)

de $1/0,4637$ para transformar Y na distância real (em cm.). A distância entre o ponto de referência e a ordenada máxima de cada pico sobre o prato foi medida com um "Profile Projector" NIKON, onde o prato foi projetado sobre uma tela e a distância Y medida pelo uso de um micrômetro acoplado ao sistema.

- c) subtrair esse valor de 7,3 cm para determinar a distância do pico ao centro de rotação do rotor, donde: $x = 7,3 - \frac{Y}{0,4637}$
- d) determinar \log_{10} de $7,3 - \frac{Y}{0,4637} = \log \tau$
- e) graficar $\log \tau$ contra tempo (min.)
- f) determinar a inclinação $= \frac{d \log \tau}{d t}$
- g) $s = \frac{1}{\omega^2} \times \frac{d \ln \tau}{d t}$ onde $\omega^2 = \text{radianos/segundo} = (2\pi \frac{r.p.m.}{60})^2$
e onde $\frac{d \ln \tau}{d t} = \frac{2,303}{60} \times \frac{d \log \tau}{d t}$
- h) dividir o valor obtido por 10^{-13} para expressar o resultado em unidades Svedberg (S). Sendo que s é o simbolo para o coeficiente de sedimentação e S é usado para expressar unidades Svedberg (por exemplo, $s = 9,3 S$).

Ressonância de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo e dos polissacarídeos: o espectro de ^{13}C -n.m.r. do heteropolissacarídeo proveniente da extração alcalina foi obtido pelo uso de um espectrômetro Bruker AM-360 WB incorporando a técnica de transformação de Fourier. O heteropolissacarídeo (42 mg) foi dissolvido em D_2O e esta solução foi colocada em um tubo de 20 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro e mantida a 33° . Os parâmetros espectrais foram "spectral width" de 18.519 Hz, "acquisition time" de 0,44 s, "pulse width" de 21,0 μs e "number of scans"

de 65.651. Para as outras determinações as amostras foram dissolvidas em D_2O , e as soluções foram colocadas em tubos com 20 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro e mantidas a 70° . O espectrômetro usado foi um modelo Varian XL-100-15, também incorporando a técnica de transformação de Fourier. Os parâmetros espectrais foram diferentes, sendo o "spectral width" de 5000 Hz, "acquisition time" de 0,40 s e "pulse width" de 20,0 μ s. Os carboidratos examinados foram a glucana, obtida via extração aquosa (50 mg, "number of scans" de 109.024), heteropolissacarídeo, obtido via extração aquosa (50 mg, "number of scans" de 124.616) e o extrato contendo trealose (200 mg, "number of scans" de 34.800).

Nos experimentos acima os deslocamentos químicos foram expressos em δ (p.p.m.), relativos à ressonância do T.M.S., determinado em experimento separado (25). Para o caso das corridas conduzidas a 33° um fator de correção de +0,6 p.p.m. foi usado, de tal forma que os valores δ correspondessem àqueles obtidos a 70° .

Componentes amino-acídicos do líquen bruto: o hidrolisado (HCl 6 M, 105° , 6h) representando em peso conhecido do líquen bruto foi analisado através de um analisador automático de amino-ácidos Spinco Modelo 120 C, empacotado com resina do tipo UR-30, com tempo decorrida de 250 min. (as condições são fornecidas pelo manual de procedimentos da Spinco 120 C-PM-1). A coluna (57 x 0,9 cm de d.i.) foi operada a 55° com tampão citrato 0,2 M, pH 3,28 utilizado para os primeiros 135 min., seguido por tampão pH 4,25, num fluxo de 65 mL/h. A análise quantitativa dos amino-ácidos foi feita colorimetricamente (ninhidrina-dicloreto de estanho, 570 nm).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento, purificação e composição do oligossacarídeo e dos polissacarídeos de *Cora panonia* (Sw.)Fr.: este líquen é conhecido comumente no Brasil como "asa de papagaio", é um dos poucos líquens cujo micossimbionte é um basidiomiceto, e que não tinha sido, até o momento, submetido a análises químicas. No presente estudo, os componentes proteicos e carboidratados foram investigados e comparados com líquens cujo micossimbionte é um ascomiceto (28).

O conteúdo proteico de *C. pavonia* é de 36% considerando a ausência de quitina, desde que na análise de amino-ácidos ao menos 83% deles foram detectados. Desta forma, uma quantidade muito pequena de quitina deve estar presente na amostra. O valor encontrado de 36% é bastante alto quando comparado com valores de 4-20% relatados para líquens ascomicetos (28). A análise dos amino-ácidos (Tabela I) revelou um alto valor para a tirosina, de 10%, a qual constituiu somente 4% do total dos amino ácidos em líquens ascomicetos (28).

Extração a quente com benzeno-etanol de *C. pavonia* remaneu material não polar que foi descartado, sendo o resíduo a seguir tratado com metanol aquoso 80% sob refluxo, que solubilizou carboidratos de baixo peso molecular e álcoois (Esquema I). O extrato, após desionização, forneceu por c.p. (sistema f) um componente principal com R_{GAL} 0,4 e rendimento de 4,3% e traços de um outro componente com R_{GAL} 1,1, identificado como manitol e com um rendimento de 0,13%, determinado por g.l.c.

ESQUEMA I

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS COMPONENTES QUÍMICOS EXISTENTES NO LÍQUEN *Cora pavonia* (S.w.) Fr. A. EXTRAÇÃO AQUOSA

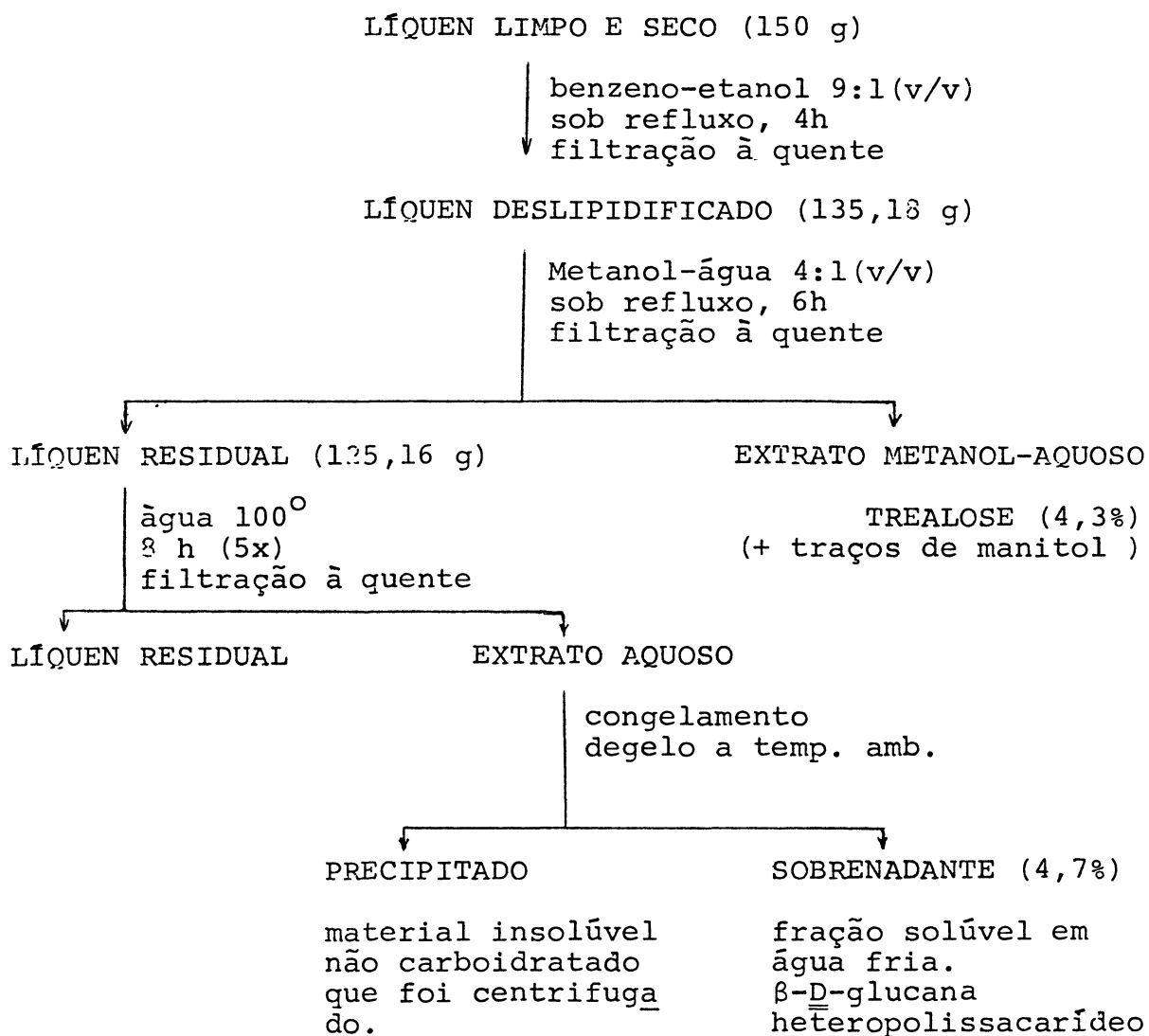


TABELA I

Composição em aminoácidos do líquen *Cora pavonia* (conteúdo proteico de 36,05 %).

Amino-ácido	PMC ^a	Amino-ácido	PMC ^a	Amino-ácido	PMC ^a
Triptofano ^b	-	Serina	4,6	Valina	5,7
Lisina	5,0	Ácido glutâmico	7,9	Metionina ^b	-
Histidina	2,2	Prolina	3,8	Isoleucina	4,3
Arginina	4,8	Glicina	4,3	Leucina	6,4
Ácido aspártico	8,8	Alanina	5,1	Tirosina	10,1
Treonina	4,7	Meia-cistina ^b	-	Fenilalanina	5,3
				TOTAL	83,0

^a Percentual da composição molar (amoníaco liberado: 1,6%)

^b Não determinado

após redução e acetilação do extrato, na forma de acetatos de alditóis (coluna a). Estes componentes não forneceram teste positivo frente ao reagente de para-anisidina. O produto da hidrólise ácida total do extrato foi caracterizado por c.p. (sistema f) como glucose, e a amostra metilada, quando analisada por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis parcialmente O-metilados (coluna a) forneceu um único pico correspondente ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol (Tabela II). Como os dados de metilação indicaram a presença de uma glucobiose não redutora, este componente foi então identificado como sendo a α , α -D-trealose, desde que tinha uma forte rotação específica de $+174^{\circ}$ indicando configuração α -D, e seu espectro de ^{13}C -n.m.r. continha seis sinais, ao invés dos doze esperados, com deslocamentos químicos típicos em δ 62,4; 71,5; 72,8; 74,3 e 95,1 correspondentes àqueles da α , α -D-trealose. O deslocamento químico de C-1 em campo relativamente alto em δ 95,1 é também indicativo de configuração α (Figura 1), (30, 35). O material foi então cristalizado na forma de dihidrato apresentando p.f. de 97° e esse mesmo valor foi obtido combinando-se o composto com um padrão.

O líquen, previamente tratado com benzeno-etanol e metanol aquoso, foi submetido a dois procedimentos com a finalidade de isolar os componentes polissacarídicos. Um deles foi uma extração aquosa a quente (Esquema I), seguida de evaporação parcial, congelamento e degelo suave. Este é um procedimento padrão no caso de líquens ascomicetos porque uma glucana insolúvel frequentemente pode ser isolada. Contudo, no presente experimento, o precipitado era de constituição não carboidratada e foi descartado. Os carboidratos no sobrenadante

TABELA II

Detecção por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados formados do extrato metanol-aquoso por análise de metilação.

Alditol ^a	T ^b	Mol % no extrato
2,3,4,6-Me ₄ - <u>D</u> -Glc	1,0	100,0

^a Coluna (a), isoterma a 160°

^b Tempo de retenção (T) relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

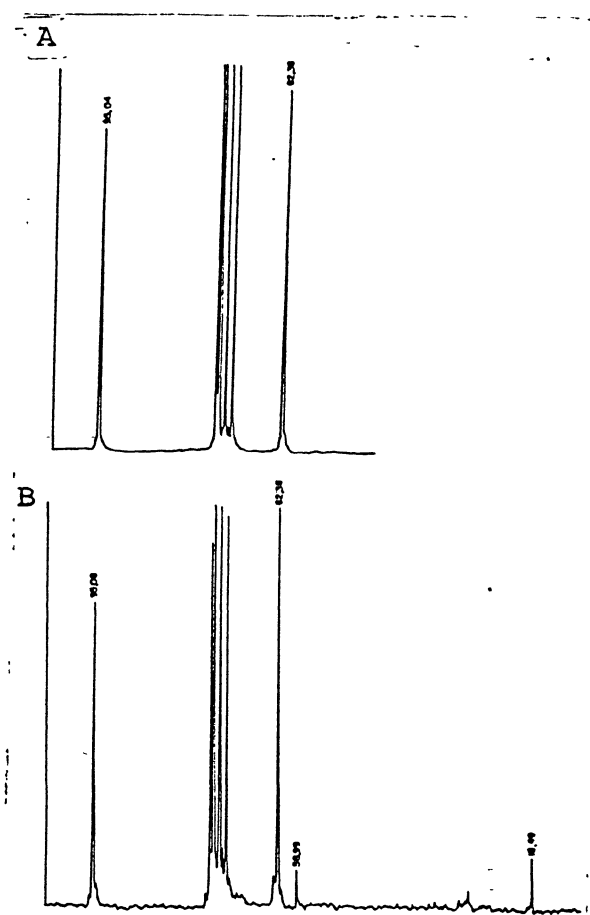
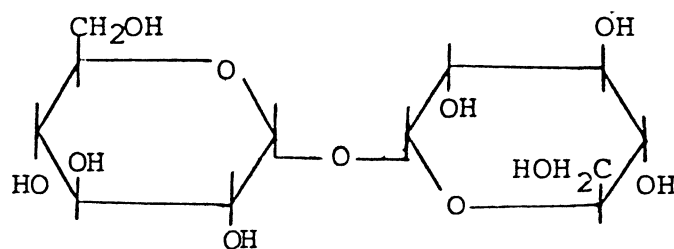


Figura 1.

Espectros de ^{13}C -n.m.r. do oligossacarídeo $\alpha,\alpha\text{-D}$ -trealose, em óxido de deutério (D_2O), a 70° . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m. baseado na ressonância do TMS obtido em um experimento separado.

A) $\alpha,\alpha\text{-D}$ -trealose padrão

B) $\alpha,\alpha\text{-D}$ -trealose isolada de *Cora pavonia* (S w.)Fr.



Estrutura do oligossacarídeo
 $\alpha,\alpha\text{-D}$ -trealose.

representavam 4,7% do líquen original (Esquema I), consistinde polissacarídeo, que após hidrólise ácida total (sistema b) foi cromatografado em papel (sistema f) e apresentou compo - nentes com migrações compatíveis com a glucose, galactose, manose e xilose. Estes componentes forneceram teste positivo frente ao reagente de para-anisidina. Após redução e acetilação do material hidrolisado a amostra foi analisada por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis (coluna a) e continha ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 5:12:22:19:15:27 (Tabela III A).

O polissacarídeo foi submetido a fracionamento com solução de Fehling originando o heteropolissacarídeo, isolado via seu complexo cúprico insolúvel e a glucana, obtida do sobrenadante. Foi necessário conduzir quatro precipitações sucessivas do heteropolissacarídeo com solução de Fehling para se obter uma amostra com relação de açúcares constante, que após hidrólise ácida total (sistema b) foi analisada por c.p. (sistema f) e apresentou componentes com migrações compatí - veis com a glucose, galactose, manose e xilose. A amostra hidrolisada foi a seguir reduzida, acetilada e analisada por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis (coluna a) e continha ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 4:10:32:29:17:8 (Tabela IV A). O conteúdo total de pentoses-desse polímero foi de 31,6% em concordância com o valor obtido acima. O heteropolissacarídeo, assim obtido, apresentou um rendimento final de 0,06%. De maneira semelhante, quatro tratamentos foram necessários para remover o heteropolissacarídeo da glucana, via precipitação com solução de Fehling antes que uma amostra pura fosse obtida num rendi-

mento de 0,04%. O produto de hidrólise ácida total (sistema b) da glucana assim purificada, foi caracterizado por c.p. (sistema f) e por g.l.c. na forma de acetato de alditol (coluna a) como glucose. Este produto hidrolisado deu teste positivo frente ao reagente de para-anisidina. O espectro de ^{13}C -n.m.r. da glucana e do heteropolissacarídeo são mostrados nas Figuras 2 e 3 A, respectivamente.

O outro processo de extração envolveu tratamento com hidróxido de potássio aquoso a quente, seguido por neutralização (AcOH) e isolamento do material (15,5%) via precipitação com etanol. O sobrenadante etanólico (rendimento de 11%) forneceu dois componentes não redutores por c.p. (sistema f) com R_I 1,0 e R_I 1,26 e que quando submetido a hidrólise ácida total (sistema a) e analisado por c.p. (sistema f) apresentou um produto com R_I 2,26 cromatograficamente semelhante a glucose, e outro componente com R_I 1,0, provavelmente inositol. Uma preparação polissacarídica livre de inositol foi obtida por precipitação com etanol, a partir da solução aquosa, e após hidrólise ácida total (sistema b) foi analisada por c.p. no mesmo sistema, e apresentando os mesmos componentes descritos anteriormente para a extração aquosa. O material hidrolisado, após redução e acetilação, foi analisado por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis (coluna a) e continha rannose, fucose, xilose manose, galactose e glucose numa relação molar de 5:9:23:31:13:28 (Tabela III B). Do primeiro processo de fracionamento com solução de Fehling, como já anteriormente descrito, obteve-se a glucana, ainda impura, com rendimento de 1,32% e o heteropolissacarídeo, que foi submetido a novo fracionamento com solução de Fehling e apresentou um rendimento de 0,18%. Após

hidrólise ácida total (sistema b) o heteropolissacarídeo foi analisado por c.p. (sistema f) nas mesmas condições e apresentando os mesmos componentes já citados para a extração aquosa. O material hidrolisado foi reduzido, acetilado e analisado por g.l.c. na forma de acetatos de alditóis (coluna a) apresentando uma relação molar de ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose de 3:13:36:32:11:5, próxima àquela obtida do material isolado via extração aquosa (Tabela IV B).

Os dois diferentes processos de extração do líquen originaram glucanas e heteropolissacarídeos virtualmente idênticos de acordo com os espectros de ^{13}C -n.m.r. semelhantes (Figuras 2 e 3 A e B, respectivamente). Desde que as estruturas e rendimentos da glucana e heteropolímero teriam sido comparáveis, quando obtidos via extração aquosa e alcalina, somente os produtos obtidos via extração aquosa foram examinados mais exclusivamente.

Testes de homogeneidade a que foram submetidos os polissacarídeos de *C. pavonia* obtidos da extração aquosa.

- ultracentrifugação: um dos mais importantes métodos para determinar a homogeneidade ou heterogeneidade de um polissacarídeo é a ultracentrifugação analítica. A presença de macromoléculas pode ser detectada, os coeficientes de sedimentação determinados e o peso molecular da molécula estimado. No caso de sistemas com múltiplos componentes, o número e a quantidade relativa desses na amostra podem ser averiguados.

O princípio do método é muito simples: as moléculas em solução são submetidas a altas forças centrífugas e suas

TABELA III

Análise por g.l.c. A) dos produtos de hidrólise ácida total da fração solúvel em água fria (sobrenadante) resultante do congelamento e degelo do extrato aquoso e B) dos produtos de hidrólise ácida total do extrato alcalino (precipitado etanólico total), na forma de acetatos de alditóis.

Produto ^a	Mol %	
	A) Ext.aquoso	B) Ext.alcalino
Ramnitól penta-O-acetato	5,0	5,0
Fucositol penta-O-acetato	12,0	9,0
Xilitol penta-O-acetato	22,0	23,0
Manitol hexa-O-acetato	19,0	21,0
Galactitol hexa-O-acetato	15,0	13,0
Glucitol hexa-O-acetato	27,0	23,0

^a Coluna (a), 130-180°/4° por minuto

TABELA IV

Análise por g.l.c. dos resultados de hidrólise ácida total dos precipitados de Fehling A) extração aquosa e B) extração alcalina, na forma de acetatos de alditóis.

Produto ^a	Mol %	
	A) Ext.aquosa	B) Ext.alcalina
Ramnitól penta- <u>O</u> -acetato	4,0	3,0
Fucositol penta- <u>O</u> -acetato	10,0	13,0
Xilitol penta- <u>O</u> -acetato	32,0	36,0
Manitol hexa- <u>O</u> -acetato	29,0	32,0
Galactitol hexa- <u>O</u> -acetato	17,0	11,0
Glucitol hexa- <u>O</u> -acetato	8,0	5,0

^a Coluna (a), 130-180°/4° por minuto

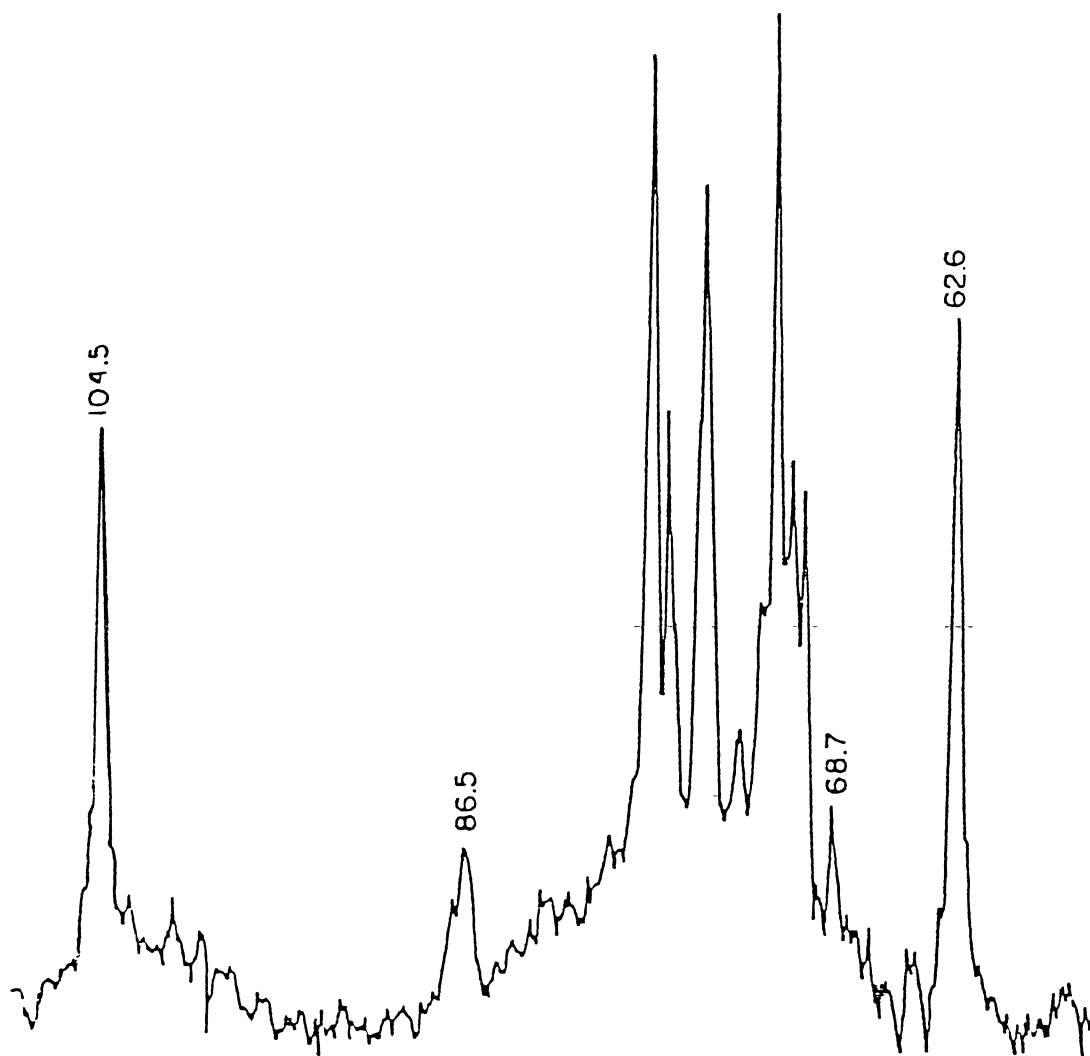


Figura 2.

Espectro de ^{13}C -n.m.r. da β -D-glucana (extração aquosa). O solvente foi D_2O a 70° e os valores numéricos são computados em δ p.p.m. baseado na ressonância do TMS obtido em um experimento separado.

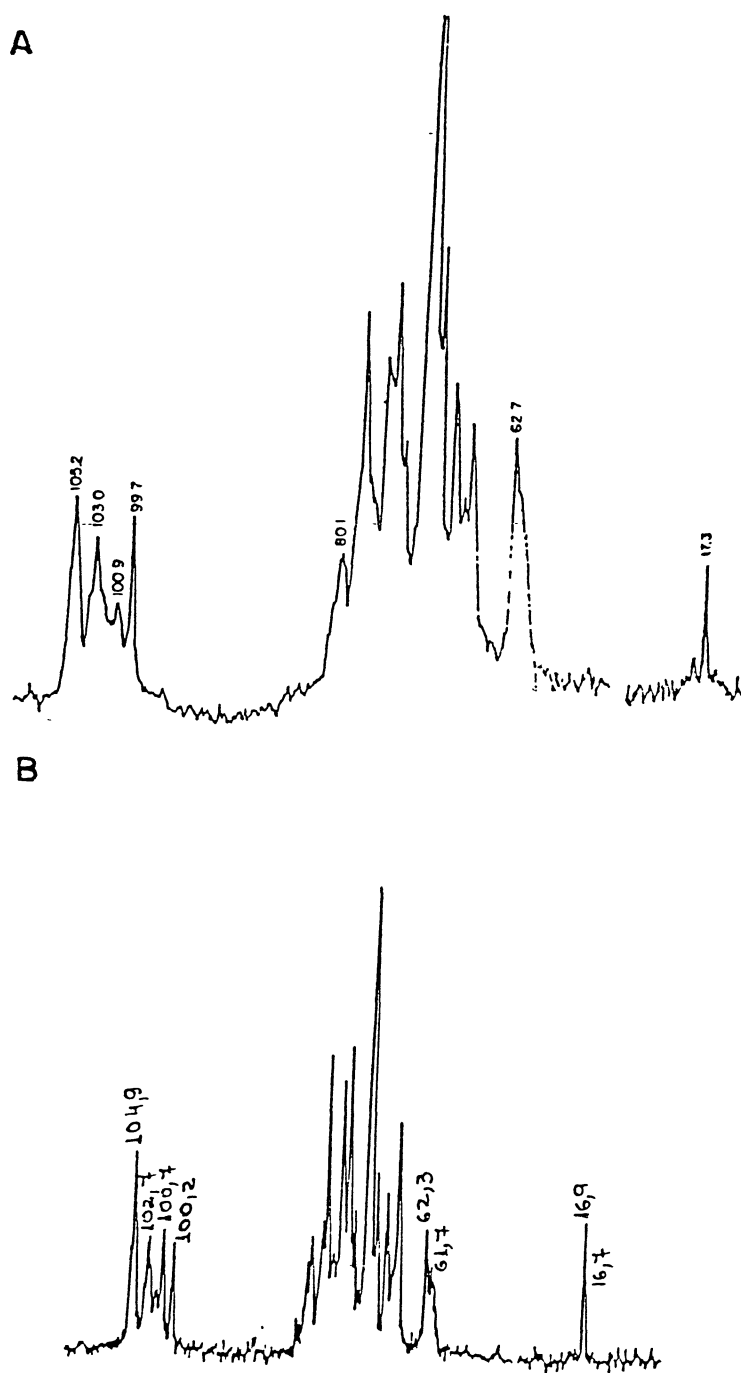


Figura 3.

- A. Espectro de ^{13}C -n.m.r. do heteropolissacarídeo (extração aquosa). O solvente foi D_2O a 70° e os valores numéricos são computados em δ p.p.m. baseado na ressonância do TMS obtido em um experimento separado. 100 MHz
- B. Espectro de ^{13}C -n.m.r. do heteropolissacarídeo (extração alcalina). O solvente foi D_2O à temperatura ambiente e os valores numéricos são computados em δ p.p.m. baseado na ressonância do TMS obtido em um experimento separado. 360 MHz.

velocidades de sedimentação medidas. Desde que moléculas individuais não podem ser diretamente observadas, a velocidade da média de todas as moléculas é medida, determinando-se sua posição na célula da centrífuga em função do tempo. A população de moléculas evidencia-se como um pico cuja ordenada máxima é uma indicação bastante precisa de sua posição.

Considerações sobre a técnica utilizada na determinação dos coeficientes de sedimentação dos polissacarídeos estudados já foram feitas em Materiais e Métodos. Em geral, se for observado um único pico, que seja simétrico e persistente em sua trajetória ao longo da célula, o soluto pode ser considerado homogêneo em ultracentrifugação, não significando contudo que seja homogêneo por outros critérios. Sabe-se que algumas misturas de macromoléculas podem dar origem a um único pico quando submetidas a ultracentrifugação. No entanto, se este pico se alargar rapidamente em sua passagem pela célula da ultracentrífuga muito provavelmente o soluto é polidisperso. Geralmente, cada pico corresponde à população molecular de um dos componentes da mistura, se este for o caso, e por isso, os coeficientes de sedimentação podem ser determinados para cada um.

Como se observa na Figura 4, tanto o componente heteropolissacarídico como a glucana mostraram-se homogêneos por ultracentrifugação com um valor de 2,6S e 1,4S respectivamente, estando livres um do outro. Se bem que considerados homogêneos (a homogeneidade se refere à estrutura química) os polímeros se apresentaram polidispersos (a polidispersão se refere a populações moleculares com pesos moleculares variados).

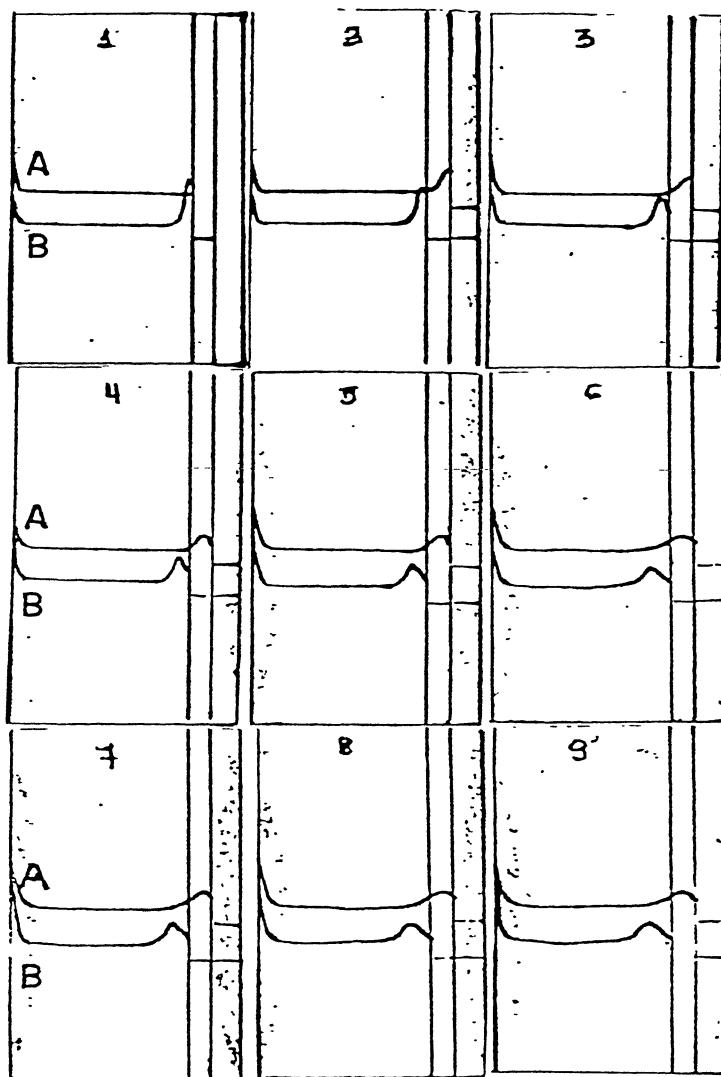


Figura 4.

Análise por ultracentrifugação dos componentes (A) β -D-glucana (1,4S) e (B) heteropolissacarídeo (2,6S). Os coeficientes de sedimentação foram determinados em uma solução de 0,45% em NaOH 0,1 M (2 ml) a 20°. As tomadas fotográficas foram feitas a intervalos de 4 minutos após a velocidade atingir 52.732 r. p.m.

Como se pôde observar a glucana se apresentou bem mais polidispersa que o heteropolissacarídeo. O cálculo do S envolve o gráfico de $\ln_e r$ (distância radial) contra o tempo ; a obtenção de uma linha reta indica medida consistente, e isso foi obtido para a glucana e o heteropolissacarídeo.

- eletroforese: o heteropolissacarídeo foi submetido a eletroforese em fita de acetato de celulose usando barbital aquoso, pH 8,6 e borato de sódio, pH 8,6. Em ambos os sistemas esse componente apresentou uma banda única para carboidrato e também uma só banda fracamente positiva para proteína, na mesma posição. O heteropolissacarídeo continha 5,1% de proteína, que poderia ser acídica e gerar a mobilidade no tampão barbital. Contudo, seu espectro de ^{13}C -n.m.r. não continha um sinal em $\delta \sim 175$ correspondente a grupo carboxil (Figura 3 A e B). O componente glucana foi examinado por eletroforese nas mesmas condições, utilizando somente tampão borato de sódio, pH 8,6. Apresentou uma só banda tanto revelado para carboidrato como para proteína, na mesma posição.

- eluição do heteropolissacarídeo em coluna de Sepharose 4B-200: a amostra analisada foi eluída nos volumes de 8 a 19 mL do eluato, com pico máximo em 12 mL de eluato. Essas frações foram reunidas e o açúcar total (18) determinado nessa fração indicou recuperação de 100% do polissacarídeo. O "dextran blue" (peso molecular médio 2×10^6) eluiu dessa coluna com pico máximo em 12 mL. (figura 5):

Tendo-se considerado então os polímeros homogêneos , dentro dos critérios dos referidos métodos, partiu-se para a análise estrutural.

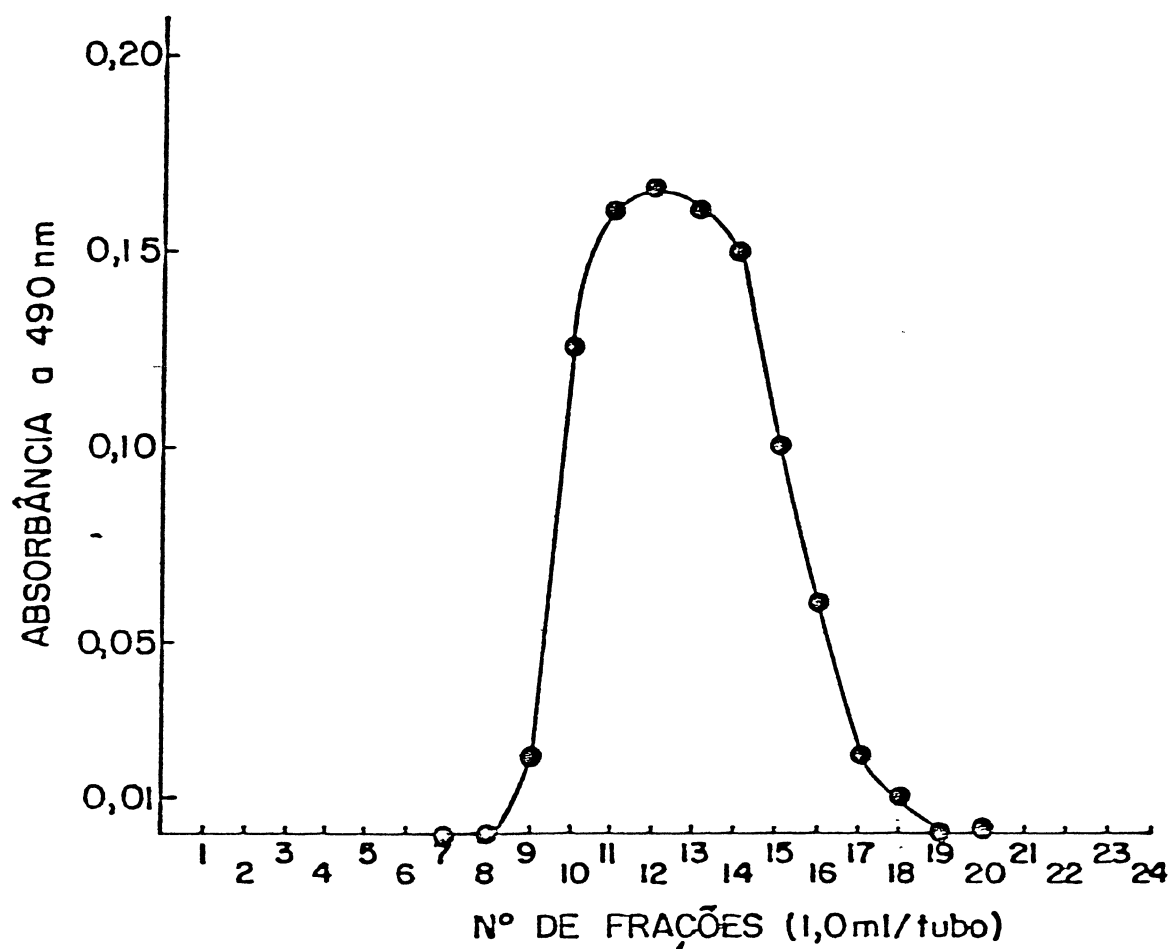


Figura 5.

Cromatografia do heteropolissacarídeo (extração aquosa) em coluna de Sepharose 4B-200 (40,0 x 1,0 cm d.i.). A amostra analisada (6mg) foi eluída com água destilada na velocidade de escoamento de 18 mL/h. Frações de 1 mL do eluato foram coletadas à temperatura ambiente.

Análise estrutural do componente glucana de *C. pavonia* obtido por extração aquosa: A rotação específica deste componente foi de $+13^{\circ}$ que é consistente com uma estrutura em configuração β -D-glucopirranana. O espectro de ^{13}C -n.m.r. (Figura 2) lembrou aqueles das glucanas obtidas dos fungos *Schizophyllum commune* e *Lentinus edodes*, sugerindo uma estrutura ramificada com resíduos em ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil (63). O espectro contém um sinal de C-1 em campo baixo (δ 104,5) correspondente a unidades em ligações β (35) e outro em δ 86,5 originário de resíduos 3-O-substituídos de β -D-glucopirranose (35,61,63). Análises de metilação da glucana de *C. pavonia* forneceu acetatos de alditóis parcialmente O-metilados que foram examinados por g.l.c.-m.s. em uma coluna capilar revestida com OV-225—OV-17, 1:3, p/p, (coluna d) que resolve derivados tri-O-metilados de glucose (24), (Tabela V). Caracterizados foram grupos terminais não redutores (21%) e unidades de glucopirranose 3-O- (30%), 6-O- (30%) e 3,6-di-O-substituídas (19%). A glucana foi submetida a uma degradação de Smith, incorporando condições hidrolíticas suaves e o produto, quando examinado por c.p. (sistemas g e h) forneceu principalmente glicerol e uma série de pontos de mobilidade mais lenta, cujas mobilidades sugeriram estruturas oligossacarídicas. A presença destes compostos e a ausência de um produto polimérico precipitável com etanol indica que a glucana não possui uma cadeia principal em ligações (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil como em muitas β glucanas de fungos (9). Ao invés disso, as ligações (1 \rightarrow 3) estão intercaladas com aquelas de (1 \rightarrow 6) como nas glucanas de *Piricularia oryzae* e *L. edodes* (64).

TABELA V

Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos da β -D-glucana.

Alditol ^a	T ^b	P ^c
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,00	21
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,31	30
2,3,4-Me ₃ -Glc	1,43	30
2,4-Me ₂ -Glc	2,03	19

^a G.l.c.-m.s. em coluna capilar revestida com OV-225 — OV-17 1:3, p/p (coluna d).

^b Tempo de retenção (T) relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

^c Percentagem total dos picos obtidos do polissacarídeo metilado.

Análise estrutural do componente heteropolissacarídico obtido por extração aquosa do líquen *C. pavonia*.

a) determinação da configuração absoluta dos componentes monossacarídicos obtidos do heteropolissacarídeo: a configuração absoluta de açúcares de ocorrência natural pode ser obtida pela rotação específica do açúcar isolado quando se tem uma quantidade apreciável do material e quando somente pequenas quantidades estão disponíveis, métodos enzimáticos podem ser usados. O heteropolissacarídeo forneceu por hidrólise ácida total (sistema a) ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose.

- determinações enzimáticas: os monômeros foram primeiramente identificados por t.l.c. (sistema i) donde isolou-se fucose e galactose. Fucose estava na forma L desde que foi oxidada pela L-fucose desidrogenase. De forma semelhante galactose oxidase modificou o componente galactose, mostrando que este tinha a forma D.

- determinação utilizando-se reagente quiral: na ausência de enzimas específicas foi necessário converter a aldose em um derivado glicosídico de um álcool quiral que é passível para exame em g.l.c. Antes de derivatizar a mistura como um todo que poderia originar, quando analisado por g.l.c. muitos picos de difícil separação e identificação, a mistura hidrolisada foi submetida a uma resolução parcial prévia, por cromatografia em coluna de celulose. As frações isoladas continham ramnose e fucose, fucose e xilose, xilose e manose, manose ; glucose, galactose, respectivamente, em ordem de suas elui -

ções. Cada fração foi então convertida em acetatos de (-)-2-octil-glicosídeos (46) e examinados por g.l.c. (coluna e). Amostras padrões de glicosídeos também foram obtidas e os tempos de retenção relativos de seus picos foram medidos em relação ao do primeiro pico a emergir (acetatos de octil-L-fucosídeos). Estes valores estão presentes na Tabela VI juntamente com as proporções relativas dos picos. Seus tamanhos relativos e ordem de emergência obtidos (coluna e), relembram de maneira muito próxima aqueles previamente observados com uma coluna capilar SP-100 (46) que não é mais disponível. Teoricamente, como se pode observar pela Tabela VI, se originam quatro picos no perfil por g.l.c., correspondentes aos derivados piranosídicos α e β , e aos derivados furanosídicos α e β , de um respectivo monômero. As frações contendo ramnose e fucose, e fucose e xilose originaram, cada qual, uns poucos picos com tempos de retenção diferentes daqueles dos derivados destes açúcares (Tabela VI, Figura 6). Se torna, por isso, necessário conduzir uma caracterização mais completa, e a espectrometria de massa por impacto eletrônico é então utilizada para mostrar identidade dos picos com aqueles dos padrões e mostrar qual pico é originário de carboidrato e quais se originam de impurezas.

Seis espectros típicos por impacto eletrônico foram obtidos dos picos correspondentes a derivados piranosil e furanosil de metilpentose, pentose e hexose (Figura. 7, A, B, C, D, E, F), (22). O espectro dos derivados piranosil e furanosil são distintos desde que as cadeias laterais dos anéis furanosídicos são removidas mais facilmente do que as dos anéis piranosídicos (44), originando um fragmento com m/e 315. Estas

TABELA VI

Tempos de retenção relativos, forma do anel, e percentagem das áreas dos picos por g.l.c. dos glicosídeos (-)-2-octil acetilados obtidos de amostras padrões e frações provenientes da coluna de celulose.

Aldose padrão ou fração contendo aldose ^a	Tempo de retenção relativo (1,00 é o tempo de retenção do primeiro pico a emergir do derivado da L-fucose) do pico. Em parênteses estão a forma do anel do derivado (furanose= F, piranose= P), percentagem da área total do pico, e atribuições dos componentes provenientes das frações obtidas na coluna de celulose.
D-Xilose	1.18 (P; 34%), 1.37 (F; 15%), 1.38 (F; 12%), 1.46 (P; 40%)
L-Xilose	1.15 (P; 29%), 1.24 (F; 22%), 1.42 (F; 9%), 1.49 (P; 40%)
D-Fucose	1.04 (P e F; 70%), 1.21 (P; 17%), 1.23 (F; 17%)
L-Fucose	1.00 (P; 47%), 1.08 (F; 29%), 1.14 (F; 12%), 1.34 (P; 13%)
L-Ramnose	0.95 (P; 76%), 1.03 (P; 11%), 1.12 (F; 13%)
D-Manose	2.40 (P; 72%), 2.43 (F; 2%), 2.66 (P; 16%), 2.95 (F; 10%)
D-Glucose	2.47 (F; 7%), 2.31 (P; 44%), 2.89 (F; 16%), 3.01 (P; 33%)
D-Galactose	2.59 (F; 50%), 2.71 (P; 24%), 3.00 (P; 8%), 3.07 (F; 18%)
L-Galactose	2.33 (P; 22%), 2.67 (F; 21%), 2.74 (F; 48%), 3.43 (P; 10%)
Fração contendo xilose-fucose	1.00 (L-Fuc, P), 1.01, 1.02, 1.04 (desconhecidos), 1.03 (L-Fuc, F), 1.14 (L-Fuc, F) 1.18 (D-Xyl, P), 1.25 (pentose desconhecida, F), 1.34 (L-Fuc, P) 1.37 (D-Xyl, F), 1.39 (D-Xyl, F), 1.46 (D-Xyl, P)
Fração contendo ramnose-fucose	0.95 (L-Rha, P), 1.00 (L-Fuc, P), 1.02, 1.04 (desconhecidos), 1.08 (L-Fuc, F), 1.14 (L-Fuc, F), 1.34 (L-Fuc, P)

^a G.l.c.-m.s. em coluna capilar de quartzo quimicamente ligada com Durowax-4 (coluna e).

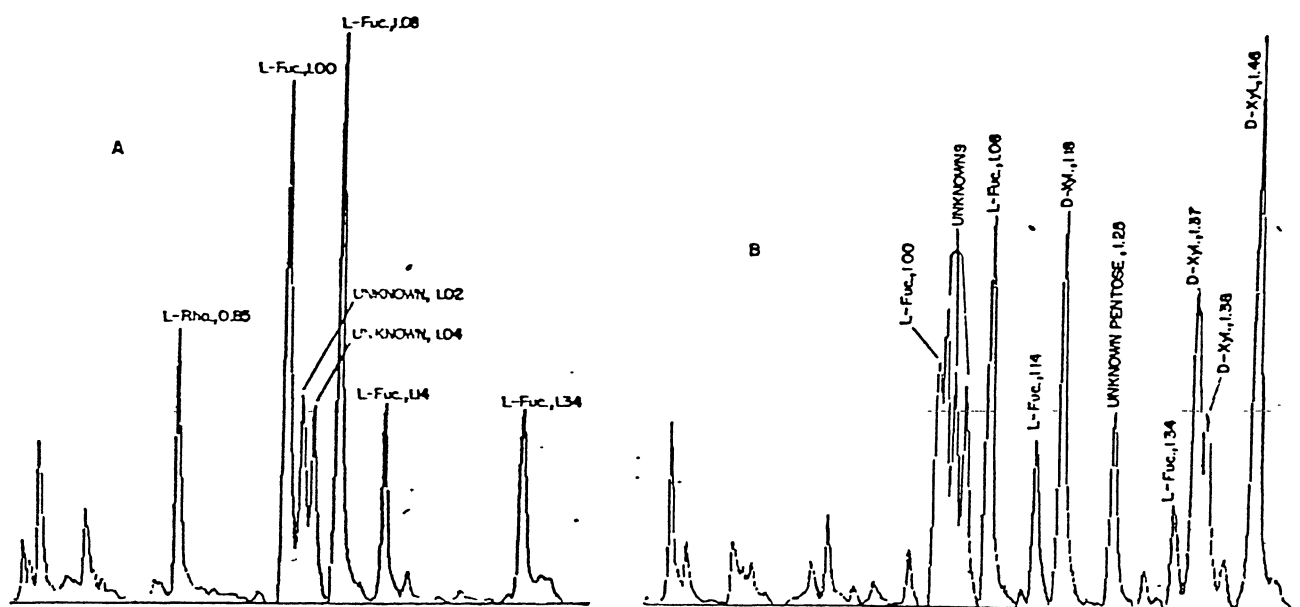


Figura 6.

Perfil obtido por g.l.c.^a dos derivados acetilados (-)-2-octil glicosídeos formados por derivatização das frações provenientes da coluna de celulose, contendo ramnose e fucose (A) e fucose e xilose (B). Atribuições dos picos estão incluídos. Os valores numéricos são relativos aos tempos de retenção da que proveniente do primeiro pico a emergir: derivados da L-fucose.

^a G.l.c.-m.s. em coluna capilar de quartzo quimicamente ligada com Durowax-4 (coluna e).

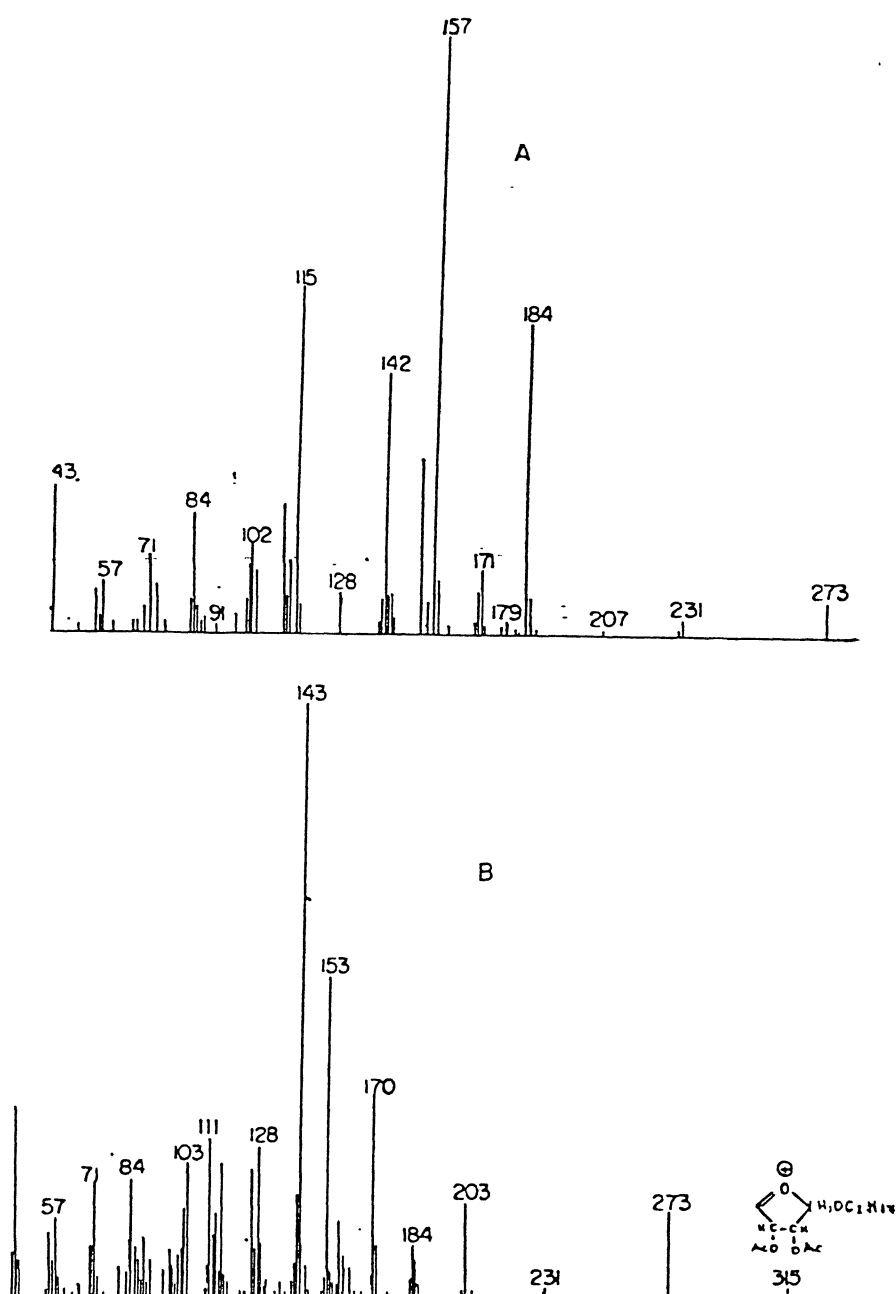
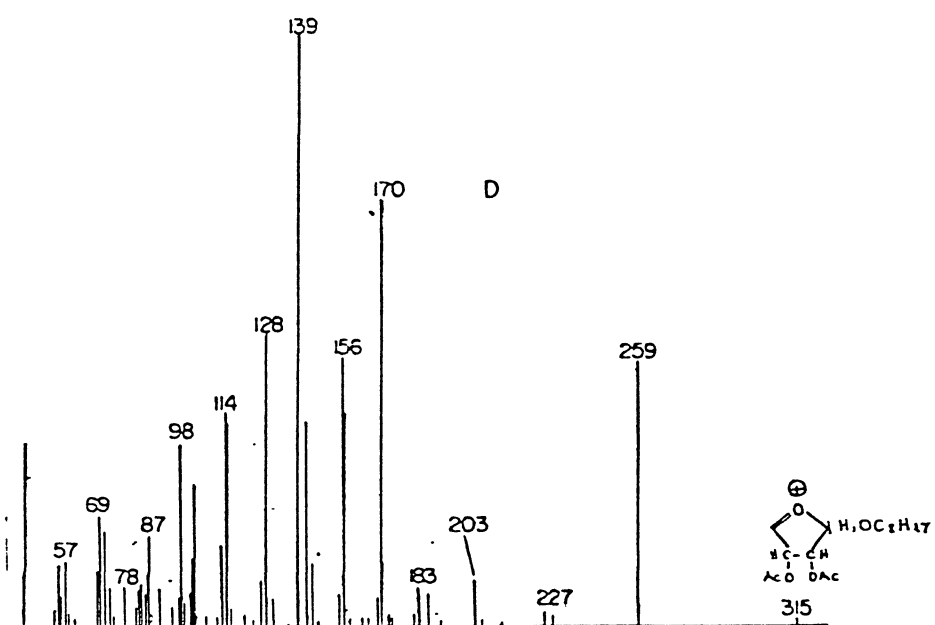
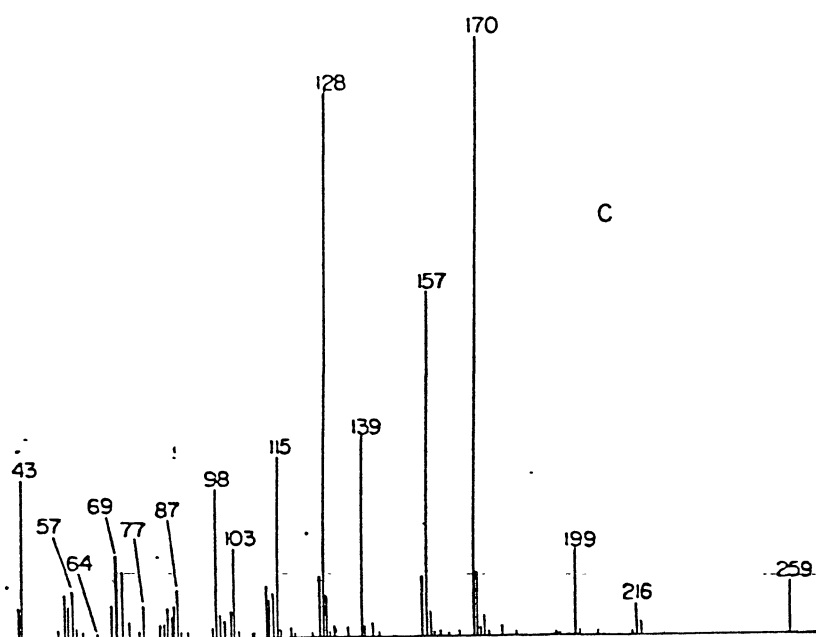
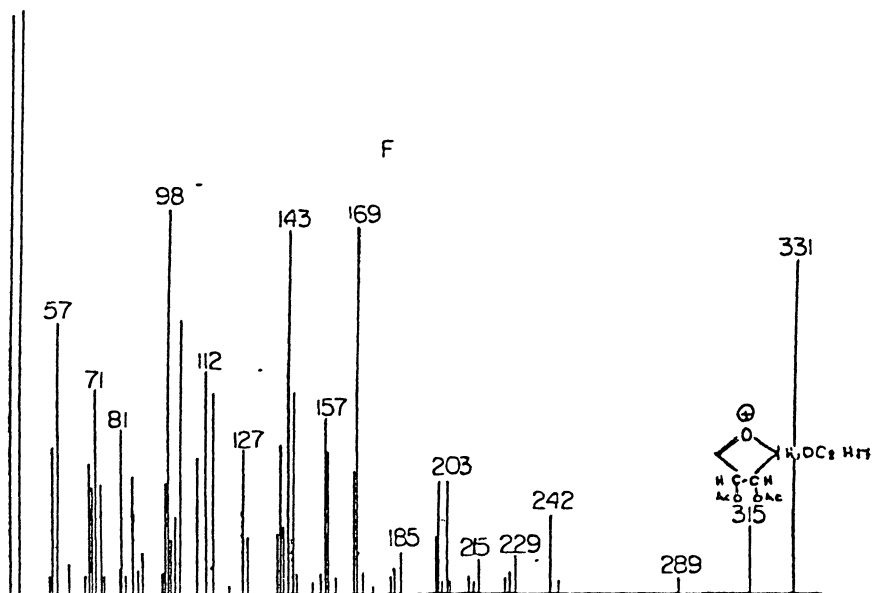
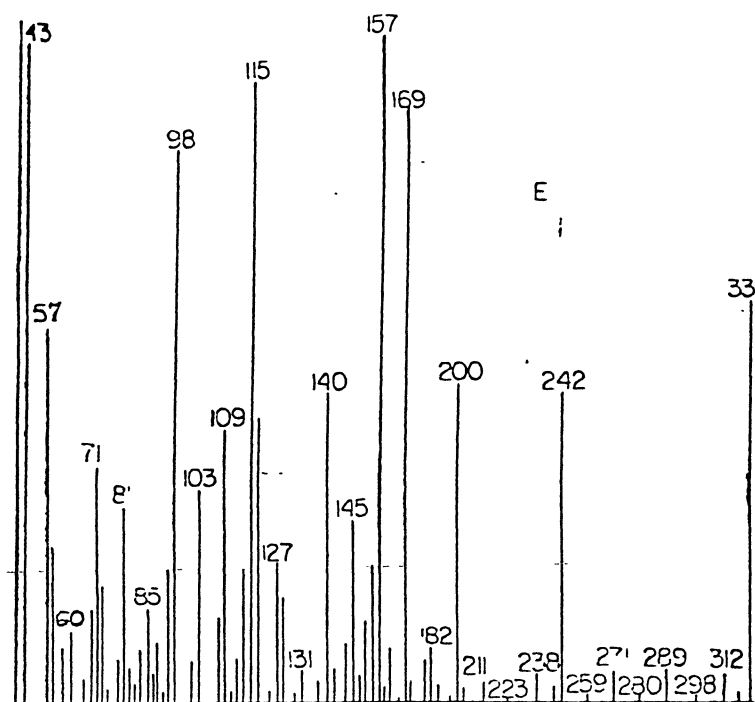


Figura 7.

Espectros de massa por impacto eletrônico dos derivados acetilados (-)-2-octil glicosídeos de fucopirranose (A), fucofuranose (B), xilopirranose (C), xilofuranose (D), manopirranose (E), e manofuranose (F).



Xilopiranoside (C), Xilofuranose (D)



Manopirranose (E), Manofuranose (F)

atribuições foram confirmadas em referência aos espectros de massa dos derivados da L-ramnose, D-xilose e D-manose respectivamente, cujos componentes principais, devem ter a estrutura piranosil (33,41).

Assim, os tempos de retenção relativos e espectros de massa dos padrões foram usados para caracterizar as frações obtidas através da coluna de celulose, que foram convertidas a octil glicosídeos acetilados, e examinados usando g.l.c.-m.s. (coluna e).

As frações obtidas da coluna de celulose contendo ramnose e fucose originaram picos (Figura 6A) correspondentes aos enantiômeros-L, e também dois picos desconhecidos menores. O espectro obtido da fração contendo fucose e xilose se mostrou mais complexo (Figura 6B) e continha três picos não identificados além daqueles correspondentes aos derivados da L-fucose, D-xilose e uma forma furanosídica de uma pentose não identificada. Derivados das frações contendo manose, glucose, e galactose foram individualmente examinadas por g.l.c.m.s. (coluna e) e corresponderam aos enantiômeros-D em virtude dos tempos de retenção típicos dos picos e fragmentos característicos obtidos através de espectrometria de massa por impacto eletrônico, como já mencionado.

b) análise estrutural do heteropolissacarídeo: o componente heteropolissacarídico foi submetido a uma degradação tipo Smith incorporando condições hidrolíticas suaves. Os produtos obtidos foram analisadas por c.p. (sistemas g e h) e consistiram de glicerol, um tetritol, e um polissacarídeo insolúvel em etanol que apresentou uma rotação específica de $+93^{\circ}$. Este produto insolúvel em etanol após hidrólise ácida

total (sistema b) foi reduzido, acetilado e analisado por g. l.c. (coluna a) e continha ramnose, fucose, xilose, manose, galactose e glucose numa relação molar de 2:1:2:80:9:6 (Tabela VII), sugerindo um núcleo α -D-manopiranosil. Desde que o polissacarídeo original tinha uma rotação específica mais baixa de $+25^{\circ}$, a configuração das unidades do outro componente principal, a D-xilose, que foi eliminada na oxidação, deveria ser β . É provável que as unidades β -D-xilopiranosil originaram, no espectro de ^{13}C -n.m.r., o forte sinal de C-1 em δ 105.2 (Figura 3 A) e δ 104.9 (Figura 3 B).

O polissacarídeo formado pela degradação se Smith do heteropolissacarídeo foi submetido a análises de metilação, e os acetatos de alditóis O-metilados foram analisados por g. l.c.-m.s. usando uma coluna capilar de DB-210 (coluna c). O pico principal mostrou que 57% das unidades manopiranosil 3-O-substituídas estavam presentes e deveriam incluir parte da cadeia principal. Grupos terminais não redutores (6%) e unidades 2,3-di-O-substituídas (5%) de manopiranosose também estavam presentes e pode ser visto pela Tabela VIII que os 68% do total dos derivados manopiranosil não correspondem aos 80% de manose existentes no polissacarídeo original após a degradação de Smith. É provável que o componente contendo manose fosse de peso molecular mais baixo que outros componentes e migrou preferencialmente através do tubo de diálise durante o processo de metilação de Haworth.

Como se pode observar pelos dados da Tabela VIII os acetatos de alditóis 2,4,6-tri-O-metilados derivados do manitol, glucitol e galactitol apresentam tempos de retenção muito próximos (resolução pobre) e por isso a identificação dos

TABELA VII

Análise por g.l.c. dos resultados da degradação de Smith incorporando condições hidrolíticas suaves do polissacarídeo insolúvel em etanol (extração aquosa) na forma de acetatos de alditóis.

Produto ^a	Mol %
Ramnitól penta- <u>O</u> -acetato	2%
Fucositol penta- <u>O</u> -acetato	1%
Xilitol penta- <u>O</u> -acetato	2%
Manitol hexa- <u>O</u> -acetato	80%
Galactitol hexa- <u>O</u> -acetato	9%
Glucitol hexa- <u>O</u> -acetato	6%

^a Coluna (a), 130-180°/4° por minuto

TABELA VIII

Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos do polissacarídeo metilado rico em manose, derivado da degradação de Smith do heteropolissacarídeo.

Alditol ^a	T ^b	P ^c
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1,00	6
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,10	12
2,4,6-Me ₃ -Man	1,48	57
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,51	12
2,4,6-Me ₃ -Gal	1,52	6
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,80	7
4,6-Me ₂ -Man	2,30	5

^a G.l.c.-m.s. em coluna capilar revestida com DB-210 (coluna c)

^b Tempo de retenção (T) relativo ao do 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol

^c Percentagem total dos picos obtidos do polissacarídeo metilado.

produtos é incerta. Por esta razão esta análise também foi conduzida usando-se uma coluna capilar de OV-17 (coluna b), que é sabido resolver esta mistura (10). O produto polissacarídico originou, na ordem de suas emergências, acetatos de 2,4,6-tri-O-metilgalactitol, 2,3,6-tri-O-metil-glucitol, 2,4,6-tri-O-metil manitol, e glucitol numa relação molar de 15:5:63:18.

As análises de metilação do heteropolissacarídeo foram difíceis, pois um grande número de acetatos de aldítóis O-metilados se formaram como produtos. Uma corrida por g.l.c.-m.s. foi originalmente conduzida numa coluna capilar de OV-225—OV-17, 3:1, p/p (coluna d) que forneceu 13 picos. Contudo, a coluna de preferência foi a de DB-210 (coluna c) onde 22 picos foram obtidos (ver a Tabela IX). Também, esta coluna poderia resolver certos derivados que poderiam ser formados na reação, nominadamente: (1) os acetatos de derivados 6-O-metilados, que tinham tempos de retenção diferentes dependendo se eles eram derivados do manitol (8,12 min), glucitol (8,96 min), ou galactitol (8,26 min), (2) os acetatos de derivados 2,6-di-O-metilados cujos valores foram: manitol (7,08 min), glucitol (7,34 min) e galactitol (7,16 min), (3) os acetatos de derivados 3,4-di-O-metilados, onde somente os derivados do manitol (8,76 min) e galactitol (9,12 min) foram testados.

Na oxidação com periodato (Figura 8), o heteropolissacarídeo consumiu após 72 h 0,92 mol/mol de oxidante com formação de 0,43 mol/mol de ácido fórmico. O último valor é próximo àquele esperado a partir dos dados de metilação (Tabela IX), que indica 40% de unidades terminais não redutoras e 11% de resíduos 6-O-substituídos.

TABELA IX

Análise por g.l.c. dos acetatos de alditóis parcialmente O-me
tilados obtidos do heteropolissacarídeo.

Alditol ^a	T ^b	P ^c	Alditol ^a	T ^b	P ^c
2,3,4-Me ₃ -Rha	0.73	1	2,4,6-Me ₃ -Glc	1.51	2
2,3,4-Me ₃ -Xyl	0.32	25	2,4,6-Me ₃ -Gal	1.52	2
2,3,4-Me ₃ -Fuc	0.34	6	3,4,6-Me ₃ -Man	1.63	1
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1.00	4	2,3,6-Me ₃ -Man	1.67	2
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1.01	2	2,3,6-Me ₃ -Gal	1.80	2
2,4-Me ₂ -Rha	1.09	1	2,3,6-Me ₃ -Glc	1.85	3
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1.10	2	2,3,4-Me ₃ -Man	1.89	2
2,4-Me ₂ -Fuc	1.13	1	2,3,4-Me ₃ -Gal	2.26	9
3,4-Me ₂ -Rha(Fuc)	1.15	1	2,6-Me ₂ -Man	2.31	10
2,4-Me ₂ -Xyl	1.19	2	6-Me-Man	2.98	10
2,4,6-Me ₃ -Man	1.43	10	3,4-Me ₂ -Gal	3.92	2

a, b, c Ver Tabela VIII.

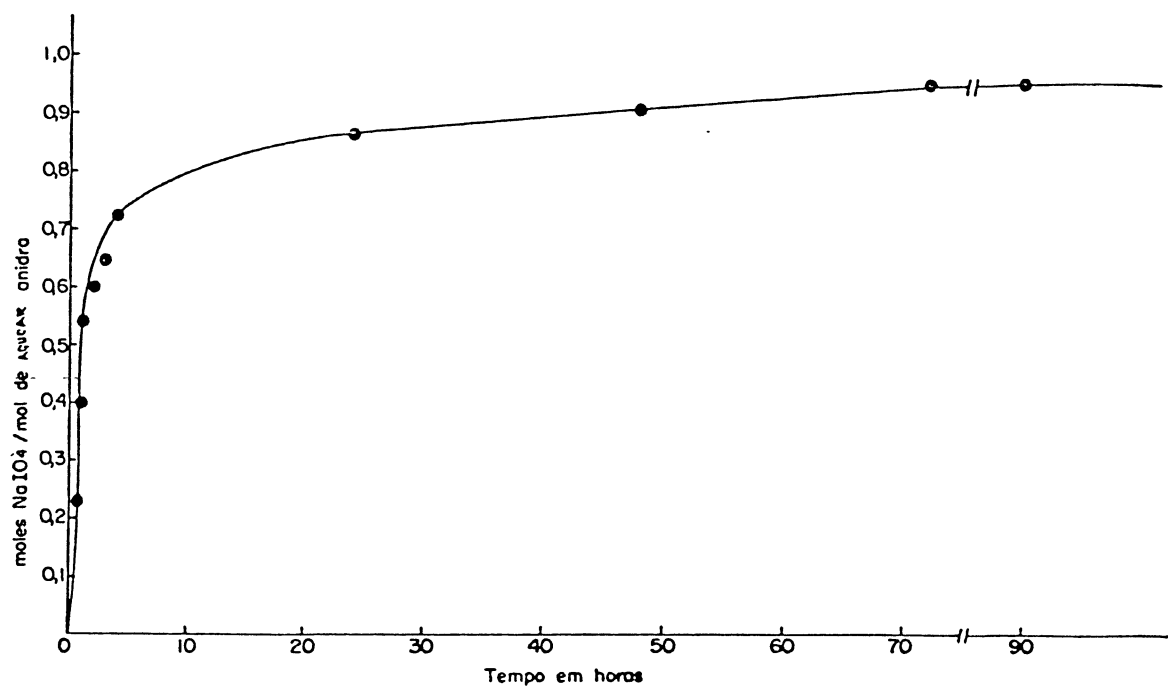


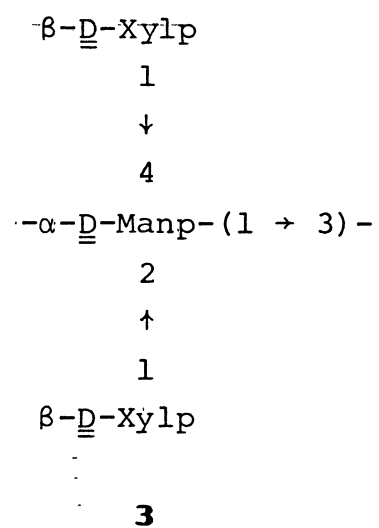
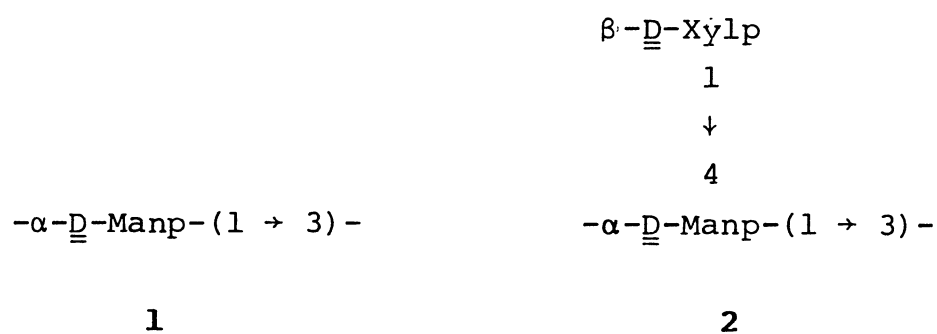
Figura 8.

Curva de oxidação com meta-periodato do heteropolissacarídeo (extração aquosa).

G.l.c. em coluna revestida com OV-225 — OV-17, 3:1 , p/p (coluna d) mostrou a presença de 7% de acetatos de 2,3-di-O-metil-xilitol, derivados do polissacarídeo metilado. Desde que este resultado poderia significar a presença de substituição 2-O- ou 4-O-, o polissacarídeo foi degradado a uma mistura de aldoses O-metiladas que foram então convertidas a metil glicosídeos. Análise por g.l.c. usando coluna de DB-210 (coluna c) mostrou um pico correspondente ao metil 3,4-di-O-metil xilopiranosídeo mas não ao isômero 2,3 , indicando assim substituição 2-O-.

Outra ambiguidade em relação aos acetatos de alditóis O-metilados já citados , em corrida efetuada em DB-210 (coluna c) repousa na resolução pobre e consequente identificação incerta dos derivados -2,4,6 do manitol, glucitol e galactitol. Contudo, como já anteriormente citado para os produtos da degradação de Smith, usando-se uma coluna capilar de OV-17 (coluna b) que sabe-se resolver esta mistura (10), uma relação molar foi obtida dos acetatos de 2,4,6-O-metil galactitol (15), 2,3,6-tri-O-metil-glucitol (5), e derivados 2,4,6-tri-O-metil do manitol (63) e glucitol (18).

Com uma cadeia principal composta principalmente de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 3), algumas estruturas predominantes podem ser propostas para o heteropolissacarídeo baseadas nos estudos da degradação de Smith e dados de metilação apresentados na Tabela IX. A cadeia principal é insubstituída (1,10%), 4-O-substituída com unidades β -D-xilopiranosil (2,10%), e 2,4-di-O-substituída com unidades β -D-xilopiranosil (3,10%).



Os outros resíduos xilopiranosil 2-Q-substituídos (~ 7 %) provavelmente fazem parte de cadeias laterais.

CONCLUSÕES

Os componentes polissacarídicos de *C. pavonia*, que são uma β -D-glucana e um heteropolissacarídeo obtidos por fracionamento de um extrato aquoso, têm estruturas típicas daquelas de basidiomicetos e devem se originar da porção micossimbionte do líquen. A β -D-glucana tem ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) e é altamente ramificada com 21% de grupos terminais não redutores, relembrando as glucanas de basidiomicetos ao invés daquelas de ascomicetos, que têm relativamente poucas ramificações (10% ou menos). Em líquens ascomicetos as β -D-glucanas são lineares apresentando tanto ligações (1 \rightarrow 6) como uma mistura de ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) (9). O heteropolissacarídeo de *C. pavonia* tem uma cadeia principal consistindo de uma alta proporção de unidades α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 3), o que é típico de basidiomicetos, contrastando com ascomicetos (9) e líquens ascomicetos (27) que tem polissacarídeos contendo manose com cadeias principais α -D-manopiranosil em ligações (1 \rightarrow 6). *C. pavonia* contém uma quantidade surpreendentemente alta (4,3%) de α - α -D-trealose e proteína (36,05%).

A α , α -D-trealose, contudo, não é exclusivamente característica de basidiomicetos, estando também presente nos líquens ascomicetos, *Umbilicaria pustulata* (50), *Dermatocarpon miniatum* (48) é numa larga variedade de células e tecidos

dos. Estes incluem plantas, algas, fungos e leveduras, bactérias, insetos, e outros invertebrados (19). Em termos de preparação da α - α -D-trealose rendimentos variando de 2% e 10-15% tem sido relatados usando-se leveduras secas e prensadas como fonte (13). Está também presente em trehala manna (25-30%) e na planta de regiões desérticas *Selaginella lepidophylla* (2,5%), originária do sul-oeste da América do Norte (13).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marcello Iacomini pela ótima e pacienciosa orientação, dedicação e responsabilidade excepcional. E também pela amizade e estímulo dispensados que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Philip Albert James Gorin pela inestimável co-orientação, amizade, pronta assistência na revisão do manuscrito e apoio técnico dado na realização de análises efetuadas no Canadá.

À professora Dra. Déa Amaral pelo apoio cordial oferecido como coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e pela determinação enzimática da D-galactose, que quando solicitada foi prontamente realizada, e ao professor Dr. Manoel Francisco Guimarães que gentilmente investigou a presença da L-fucose e L-galactose com a L-fucose desidrogenase.

Ao professor Dr. José Batista Chaves Corrêa pela colaboração incansável nas análises de cromatografia líquida-gasosa.

Aos professores Dr. Aguinaldo José do Nascimento, Dra. Glaci Theresinha Zancan, Dr. José Hazencleve Duarte, Dr. José Domingos Fontana, e Dr. Marco Aurélio Lacombe Feijó pelo apoio e sugestões produtivas oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora e amiga sincera Lys Mary Cândido pelo estímulo, ânimo e companheirismo.

Ao professor Dr. Ralph João George Hertel do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, pela identificação do líquen.

Ao Dr. Eugenio Ruhle pela determinação de proteína total com as facilidades oferecidas pelo Ministério de Agricultura - Paraná.

À pós-graduanda Madalena Baron, com respeito e sincera amizade e ao Paulo Odebrecht, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Às professoras Dra. Fany Reicher, Maria Eugênia Rabello Duarte, Gissélia Rabello Duarte e colegas de pós-graduação professora Mírian Blümel, Claudette Luiza Schneider, Elisa Rabello Duarte, Izilda Devincenzi e Maria de Lourdes Corradi C. da Silva pelo agradável convívio nos laboratórios do setor de química de carboidratos.

Ao Renato Luiz Novak e Tereza Nanci Loppnow pela interminável paciência na excelente execução do trabalho datilográfico.

Ao Lauro Novak pela competente ajuda na confecção dos gráficos apresentados neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga e auxiliar Idalina Mensen dos Santos pelo cuidado excepcional com meu filho, o que me possibilitou trabalhar tranquila.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas pela assistência.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao amigo de sempre Paulo José Skroch, pela gravura executada para esta capa.

TRABALHOS SUBMETIDOS E ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; FEIJÓ, M.A.L.; ZANIN, S.M. W. and HOGGE, L. Assignment and absolute configuration of monosaccharide components of complex heteropolysaccharide by g.l.c.-m.s. of derived acetylated (-)-2-octyl glycosides. Arq. Biol. Tecnol. (Paraná), no prelo.
2. IACOMINI, M.; ZANIN, S.M.W.; FONTANA, J.D.; HOGGE, L. and GORIN, P.A.J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. Carbohydr. Res., submetida a publicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBAUM, H.G. & UMBREIT, W.W. Differentiation between ribose-3-phosphate and ribose-5-phosphate by means of the orcinol-pentose reaction. J. Biol. Chem., 167: 369-376, 1947.
2. ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydr. Res., 5: 340-345, 1967.
3. AMARAL, D.; KELLY-FALCOZ, F.; HORECKER, B.L. Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. Meth. Enzymol., 9: 87-92, 1966.
4. ANDERSON, D.M.W., GREENWOOD, C.T.; HIRST, E.L. Physico-chemical studies on starches. Part II. The oxidation of starches by potassium metaperiodate. J. Chem. Soc., 225-231, 1955.
5. ASPINALL, G.O.; HIRST, E.L.; WARBURTON, M. The alkali-soluble polysaccharides of the lichen *Cladonia alpestris* (reindeer moss). J. Chem. Soc., 651-655, 1955.
6. BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; O'MANT, D.M.; STACEY, M. Studies of *Aspergillus niger*. Part VI. The separation and structures of oligosaccharides from nigeran. J.

Chem. Soc., 2448-2454, 1957.

7. BARKER, S.A.; BOURNE, E.J.; STACEY, M. Studies of *Aspergillus niger*. Part I. The structure of the polyglucosan synthesised by *Aspergillus niger* 152. J. Chem. Soc., 3084-3090, 1953.
8. BARKER, S.A. & SOMERS, P.J. A spectrophotometric method for the determination of formic acid in the periodate oxidation of carbohydrate. Carbohydr. Res., 3: 220-224, 1967.
9. BARRETO-BERGTER, E. & GORIN, P.A.J. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 41: 67-103, 1983.
10. BARRETO-BERGTER, E.; HOGGE, L.; GORIN, P.A.J. Gas-liquid chromatography of partially methylated alditol acetates on capillary columns of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 97: 147-150, 1981.
11. BASSIEUX, D.; GAGNAIRE, D.; VIGNON, M. Étude par r.m.n. ^{13}C et ^1H du (1 \rightarrow 6)- β -D-glucans et des oligosaccharides linéaires et cycliques correspondants. Carbohydr. Res., 56: 19-33, 1977.
12. BERZELIUS, J.J. Versuche über die Mischung des Isländischen Moores und seine Anwendung als Nahrungsmittel. J. Chem. Phys., 7: 317-352, 1815.
13. BIRCH, G.G. Trehaloses. Adv. Carbohydr. Chem., 18: 201-225, 1963.
14. BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Hydrolysis of methylated

- polysaccharides. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 296-298, 1965.
15. BUSTON, H.W. & CHAMBERS, V.H. Some cell-wall constituents of *Cetraria islandica* ("Iceland moss"). Biochem.J. 27: 1691-1702, 1933.
 16. CHANDA, N.B.; HIRST, E.L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). J. Chem. Soc., 1951-1958, 1957.
 17. DISCHE, Z. Color reactions of pentoses. Meth. Carbohydr. Chem., 1: 484-488, 1962.
 18. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356, 1956.
 19. ELBEIN, A.D. The metabolism of α - α -trehalose. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 30: 227-256, 1974.
 20. FILHO, L. & RIZZINI, C.T. Manual de Liqueologia Brasileiro. 1ª ed. Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, 1976. p. 1-205.
 21. FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M.; SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M. Polysaccharides in lichens and fungi. II. Antitumor activities on sarcoma-180 of the polysaccharide preparations from *Gyrophora esculenta* Miyoshi, *Cetraria islandica* (L). Ach. var. *orientalis* Asahina, and some other lichens. Gann, 59: 421-432, 1968.

22. GERWIG, G.J.; KAMERLING, J.P.; VLIEGENTHART, J.F.G. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c. Carbohydr. Res., 62: 349-357, 1978.
23. GORIN, P.A.J. & BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINALL, G.O. ed. THE POLYSACCHARIDES. New York and London, Academic Press. 1983. v.2, p. 366-409.
24. GORIN, P.A.J.; GIBLIN, E.M.; SLATER, G.P.; HOGGE, L. Improved resolution of O-methylalditol acetates by gas-liquid chromatography on capillary columns with blended coatings of OV-17 and OV-225. Carbohydr. Res., 106: 235-238, 1982.
25. GORIN, P.A.J.; HASKINS, R.H.; TRAVASSOS, L.R.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Further studies on the rhamnomannans and acidic rhamnomannans of *Sporothrix schenckii* and *Ceratomyces stenoceras*. Carbohydr. Res., 55: 21-33, 1977.
26. GORIN, P.A.J.; HORITSU, K.; SPENCER, J.F.T. An exocellular mannan, alternately linked 1,3- β and 1,4- β from *Rhodotorula glutinis*. Can. J. Chem., 43: 950-954, 1965.
27. GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res., 128: 119-132, 1984.
28. _____. Structural diversity of galactomannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res., accepted for publication.

29. GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano- α -D-mannopyranans from yeasts. Carbohydr. Res. 105: 283-287, 1982.
30. _____. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can. J. Chem., 53: 1212-1223, 1975.
31. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Isolation of mannose - containing polysaccharides of yeasts and preparation of pmr spectra. Adv. Appl. Microbiol., 13: 40-42, 1970.
32. GRANICHSTÄDTEN, H. & PERCIVAL, G.V. The polysaccharides of Iceland moss (*Cetraria islandica*). Part I. Preliminary study of the hemicelluloses. J. Chem. Soc., 54-58, 1943.
33. GREEN, J.W. The glycofuranosides. Adv. Carbohydr. Chem., 21: 95-142, 1966.
34. GUIMARÃES, M.F.; RIGO, L.U. ; VEIGA, L.A. Metabolism of 6-deoxyhexoses in *Pullularia pullulans*. Biochemistry and genetics of yeasts, ed. A. STOPPANI, M. BACILA and B.L. HORECKER. Academic Press, N.Y. 161-170, 1978.
35. HALL, L.D. & JOHNSON, L.F. Chemical studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy: chemical shift dependence of oxygenated derivatives. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 509-510, 1969.
36. HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J. Chem. Soc., 107: 8-16, 1915.

37. HAWORTH, W.N.; HEATH, R.L.; PEAT, S. The constitution of yeast mannan. J. Chem. Soc., 833-842, 1941.
38. HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides: general procedures. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 357-361, 1965.
39. HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 287-296, 1965.
40. HOUGH, L.; JONES, J.K.N.; WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc. 1702-1706, 1950.
41. HUDSON, C.S. Relations between rotatory power and structure in the sugar group. VI. The rotatory powers of the alpha and beta forms of methyl d-xyloside and of methyl l-arabinoside. J. Am. Chem. Soc., 47: 265-268, 1925.
42. IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C.L.; GORIN, P.A.J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (reindeer moss); *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*. Carbohydr. Res., accepted for publication.
43. KARRER, P. & JOOS, B. Polysaccharide XXX. Zur Kenntnis des Isolichenins. Z. Physiol. Chem., 141: 311-315, 1924.
44. KOCHETKOV, N.K. & CHIZHOV, O.S. Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. Adv. Carbohydr. Chem., 21: 39-93, 1966.

45. KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. Angew. Chem., 67(1): 32, 1955.
46. LEONTEIN, K.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of the ir acetylated glycosides formed from chiral alcohols. Carbohydr. Res., 62: 359-362, 1978.
47. LINDBERG, B. Methylation analysis of polysaccharides. Meth. Enzymol., 28: 178-195, 1972.
48. _____. Studies on the chemistry of lichens. VIII. Investigation of a *Dermatocarpon* and some *Rocella* species. Acta Chem. Scand., 9: 917-919, 1955.
49. LINDBERG, B. & MCPHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. Acta Chem. Scand., 8: 985-988, 1954.
50. LINDBERG, B. & WICKBERG, B. Studies on the chemistry of lichens. III. Disaccharides from *Umbilicaria pustulata* (L) Hoffm. Acta Chem. Scand., 7: 140-142, 1953.
51. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
52. MEYER, K.H. & GÜRTLER, P. Recherches sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. Helv. Chim. Acta., 30: 751-761, 1947.
53. _____. Recherches sur l'amidon. XXXII. L'isolichénine. Helv. Chim. Acta., 30: 761-765, 1947.

54. MIČOVIĆ, V.M.; HRANISAVLJEVIĆ-JAKOVLJEVIĆ, M.; MILJKO -
VIĆ-STOJANOVIĆ, J. Structural study of polysacchari -
des from the oak lichen *Evernia prunastri* (L) ach. Car-
bohydr. Res., 10: 525-533, 1969.
55. NEUMÜLLER, G. and VASSEUR, E. The influence of pH on
the periodate oxidation of carbohydrates. Arkiv för ke-
mi, 5(21): 235-245, 1953.
56. NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURONO, G.; FUKU
OKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble consti
tuents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of
Lasallia, *Usnea*, and *Cladonia* species. Chem. Pharm. Bu-
ll., 22(11): 2692-2702, 1974.
57. NISHIKAWA, Y.; TANAKA, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Po
lylsaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumour
active O-acetylated pustulan-type glucans from the li
chens of *Umbilicaria* species. Chem. Pharm. Bull., 18
(7): 1431-1434, 1970.
58. OHLWEILER, O.A. Teoria e prática de análise quantitati-
va inorgânica. Brasília, Editora Universidade de Brasília,
1968, v. 4, p. 1001-1004.
59. PARTRIDGE, S.M. Aniline hydrogen phthalate as a spraying
reagent for chromatography of sugars. Nature, 164: 443,
1949.
60. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; TURVEY, J.R.; MORGAN, K. The s-
tructure of isolichenin. J. Chem. Soc., 623-629, 1961.
61. PREVIATO, J.O.; GORIN, P.A.J.; HASKINS, R.H.; TRAVASSOS,

- L.R. Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii*. Exp. Mycol., 3: 92-105, 1979.
62. RIBEIRO, L.P.; MITIDIERI, E.; AFFONSO, O.R. Paper electrophoresis, a review of methods and results. N.Y., Elsevier Publishing Company, 1961. p. 210-215.
 63. SAITÔ, H.; OHKI, T.; TAKASUKA, N.; SASAKI, T. A ^{13}C -n.m.r.-spectral study of a gel-forming, branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. Carbohydr. Res., 58: 293-305, 1977.
 64. SASAKI, T. & TAKASUKA, N. Further study of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. Carbohydr. Res., 47: 99-104, 1976.
 65. SAWARDEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., 37: 1602-1604, 1965.
 66. SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. Meth. Carbohydr. Chem., 5: 38-44, 1965.
 67. SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96: 282-292, 1979.
 68. SHIBATA, S.; NISHIKAWA, Y.; TAKEDA, T.; TANAKA, M.; FUKUOKA, F.; NAKANISHI, M. Studies on the chemical struc-

- tures of the new glucans isolated from *Gyrophora esculenta* Miyoshi and *Lasallia papulosa* (Ach.) Llano and their inhibiting effect on implanted sarcoma 180 in mice. Chem. Pharm. Bull., 16(8): 1639-1641, 1968.
69. ST.GROTH, S.F.; WEBSTER, R.G.; DATYNER, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim. Biophys. Acta., 71: 377-391, 1963.
 70. TAKAHASHI, K.; KON, T.; YOKOTA, I.; SHIBATA, S. Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. Carbohydr. Res., 89: 166-173, 1981.
 71. TAKEDA, T.; FUNATSU, M.; SHIBATA, S.; FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens and fungi. V. Antitumour active polysaccharides of lichens of *Evernia*, *Acroscyphus* and *Alectoria* spp. Chem. Pharm. Bull., 20(11): 2445-2449, 1972.
 72. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444, 1950.
 73. ULANDER, A. & TOLLENS, B. Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Flechten. Chem. Ber., 39: 401-409, 1906.
 74. WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A.A.; SINGH, P.P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 235-275, 1976.
 75. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Acetylation. Meth. Carbohydr. Chem., 2: 211-215, 1963.

76. YOKOTA, I. & SHIBATA, S. A polysaccharide of the lichen *Stereocaulon japonicum*. Chem. Pharm. Bull., 26(9):2668-2670, 1978.
77. YOKOTA, I.; SHIBATA, S.; SAITÔ, H. A ^{13}C -n.m.r. analysis of linkages in lichen polysaccharides: an approach to chemical taxonomy of lichens. Carbohydr. Res., 69: 252-258, 1979.